

Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider isolert fra

Ximenia americana

Zayneb Murtatha



Mastergradsoppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

VÅR 2010

Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider isolert fra

Ximenia americana



Mastergradsoppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

VÅR 2010

Zayneb Murtatha

Oslo, mai 2010

Veileder:

Professor Berit Smestad Paulsen

Innholdsfortegnelse

Innholdsfortegnelse	3
Forord	7
1. Forkortelser	8
2. Sammendrag	12
3. Innledning.....	14
3.1 Polysakkarider i tradisjonell medisin.....	14
3.2 Polysakkarider	14
3.2.1 Strukturelle polysakkarider i plantecellevegg	15
3.2.2 Cellulose	16
3.2.3 Hemicellulose	16
3.2.4 Pektiner	17
3.2.4.1 Homogalakturonan.....	18
3.2.4.2 Rhamnogalakturonan I (RG-I).....	18
3.2.4.3 Rhamnogalakturonan II (RG-II).....	18
3.2.4.4 Arabinaner.....	19
3.2.4.5 Arabinogalaktaner	20
3.2.5 Strukturelltrekk til bioaktive pektintype polysakkarider	21
3.3 Immunmodulerende aktivitet	21
3.3.1 Komplementsystemet	21
3.3.2 Makrofager	24
3.4 <i>Ximenia americana</i> L.	25
3.4.1 Taksonomisk Klassifisering	26

3.4.2 Botanikk og habitat	26
3.4.3 Tradisjonell bruk av <i>Ximenia americana</i>	27
3.4.5 Tidligere forskning.....	28
Innholdsstoffer	28
Biologisk aktivitet	28
4. Oppgavens målsetning	30
5. METODER OG MATERIALER.....	31
5.1 Generelle metoder	31
5.1.1 Vannkvalitet.....	31
5.1.2 Innveiging	31
5.1.3 Filtrering	31
5.1.4 Sentrifugering.....	32
5.1.5 Blanding av løsninger	32
5.1.7 Volumreduksjon	32
5.1.8 Ultrafiltrering.....	33
5.1.9 Syrevasking av glassutstyr	35
5.1.10 Frysetørking.....	36
5.1.11 Vasking av dialyseslanger	37
5.1.12 Dialyse	38
5.1.14 Måling av PH.....	40
5.2 Isolering og rensing av polysakkarider	41
5.2.1 Ekstraksjon med organiske løsemidler.....	41
5.2.2 Ekstraksjonen med 50 % etanol	41
5.2.3 Ekstraksjon med vann ved 50 °C og 100 °C	43
5.2.4 Ionebytterkromatografi.....	44
5.2.5 Gelfiltrering	49
5.3 Kvalitativ og Kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold	52
5.3.1 Fenol – svovelsyretest	52

5.3.2 Monosakkaridbestemmelse	55
5.3.2.1 Metanolyse	55
5.3.2.2 TMS-derivatisering	57
5.3.2.3 Gasskromatografi	59
5.3.3 FPLC	61
5.4 Strukturoppklaring	65
5.4.1 Metylering, med følgende hydrolyse, reduksjon og acetylering.....	65
5.4.1.1 Karboksylering	65
5.4.1.2 Metylering	68
5.4.1.3 Hydrolyse.....	70
5.4.1.4 Reduksjon	72
5.4.1.5 Acetylering.....	74
5.4.2 GC-MS.....	76
5.4.3 Enzym degradering.....	77
5.4.3.1 Separering med PD-10 Desalting kolonne.....	79
5.5 Biologisk aktivitet	80
5.5.1 NO frigjøring fra mikrofager	80
5.5.2 Komplementfikseringstesten	83
6. Resultater og diskusjon	90
6.1 Isolering av polysakkarider	90
6.1 Ekstraksjon	92
6.1.2 Ionebytterkromatografi- ANX Sepharose 4 fast flow	92
6.2 Molekylvektfordistribusjon	95
6.3 Biologisk aktivitet etter Ionebytterkromatografi	98
6.3.1 Resultater fra komplementfikseringstest.....	98
6.4 Separasjon ved hjelp av gelfiltrering	101
6.5 Monosakkaridinnhold.....	103
6.6 Bingsforhold	107

6.7 Biologisk aktivitet etter gelfiltrering.....	115
6.7.1 Måling av NO-frigjøring fra makrofager	115
6.7.2 Resultater fra komplementfikseringstest.....	116
6.8 Strukturoppklaring etter enzymatisk degradering	120
6.8.1 Enzymdegradering.....	120
6.8.2 Monosakkaridsammensetning	121
6.8.3 Biologisk aktivitet etter enzymdegradering	123
6.8.3.1 Komplementfikseringstest	123
7. Mulighet for videre studier	124
8. Konklusjon	125
9.Reagensliste.....	127
10. Referanseliste.....	129

Forord

Denne mastergradoppgaven ble utført ved Avdelingen for Farmasøytisk kjemi ved farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, og ved Folkehelseinstituttet i perioden mars 2009 – mai 2010.

Jeg ønsker å takke følgende personer

- ❖ Min hovedveileder Professor Berit Smestad Paulsen for dyktig veiledning og enestående inspirasjon under arbeidet med masteroppgaven.
- ❖ Stipendiatene Tom Erik Grønhaug, Ingvild Austarheim for god hjelp og praktisk veiledning på laboratoriet.
- ❖ Kari Tvete Inngjerdningen for å utføre testen på makrofagene.
- ❖ Finn Tønnesen, Atle Haugen, suthajini Yogarajah for tilrettelegging, gjennomføring av diverse tester, og elles all hjelpsomhet.
- ❖ Terje E. Michaelsen og Anne Cathrine Vesterheim for veiledning i forbindelse med biologisk testing på folkehelsa.
- ❖ Alle ansatte og hovedfagsstudenter for godt selskap og stor hjelpsomhet.
- ❖ Familie og venner for støtte og oppmuntring gjennom studiet.

Oslo, mai2010

Zayneb murtatha

1. Forkortelser

α	Alfaanomere monosakkarider der OH-gruppen Ved C1 har samme konfigurasjon som sukkeret selv (D eller L)
AcOAc	Eddiksyreanhydrid
AG-I	Arabinogalaktan type I
AG-II	Arabinogalaktan type II
Ara	Arabinose
APC	Antigenpresenterende celler
ANX	Dietylaminopropyl
AUC	Arealet under kurven
β	Beta indikerer at OH-gruppen ved C1 har motsatt posisjon som –OH på C6.
C1-6	Karbonatomnummer 1-6 i et monosakkarid
COOH	Syregruppe
D	D-sukker med hydroksylgruppe i kiralt karbon rettet mot høyre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon
Da	Dalton
<i>f</i>	Furanosform, femring
FHI	Nasjonalt Folkehelseinstitutt
FI	Farmasøytisk institutt
FID	Flammeionisasjonsdetektoren
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HGA	Homogalakturonan
Gal	Galaktose

GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
h	Høyde
ICH ₅₀	Konsentrasjon som gir 50% hemming av hemolyse
L	L-sukker med hydroksylgruppe i kiralt karbon rettet mot venstre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon
LPS	Lipopolysakkarid
Man	Mannose
Me	Metylgruppe
MS	Massespektrometri
M _w	Molekylvekt
MWCO	Molecular Weight cut off
n.d	not detected
NO	Nitrogenoksid
OH	Hydroksylgruppe
<i>P</i>	Pyranoseform, seksring
PM II	<i>Plantago Major</i> L, fraksjon II
RG-I	Rhamnogalakturonan I
RG-II	Rhamnogalakturonan II

Rha	Rhamnose
Rpm	runder per minutt
SRBC	Sensitiviserte røde blodceller fra sau
T	Terminal
Xyl	Xylose

Fraksjonene

XAERÅ	Råekstrakt etter ekstraksjon med 50% etanol
XA50VRÅ	Råekstrakt etter ekstraksjon med 50 °C vann
XA100VRÅ	Råekstrakt etter ekstraksjon med 100 °C vann
XAEN	Nøytral fraksjon isolert fra 50% etanolekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient
XA50VN	Nøytral fraksjon isolert fra 50 °C vannekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient
XA100VN	Nøytral fraksjon isolert fra 50 °C vannekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient
XAESI	Sur fraksjon isolert fra 50% etanolekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient
XA50VSI	Sur fraksjon isolert fra 50 °C vannekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient
XA50VSII	Sur fraksjon isolert fra 50 °C vannekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient

XA50VSIII	Sur fraksjon isolert fra 50 °C vannekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient
XA100VSI	Sur fraksjon isolert fra 100 °C vannekstrakt etter eluering på Ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient
XA100VSII	Sur fraksjon isolert fra 100 °C vannekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient.
XA50VSI-G1	Fraksjon 1 etter separasjon av XA50VSI på gelfiltreringskolonne Sephacryl S-200.
XA50VSI-G2	Fraksjon 2 etter separasjon av XA50VSI på gelfiltreringskolonne Sephacryl S-200.
XA50VSII-G1	Fraksjon 1 etter separasjon av XA50VSII på gelfiltreringskolonne Sephacryl S-200.
XA50VSIII-G1	Fraksjon 1 etter separasjon av XA50VSIII på gelfiltreringskolonne Sephacryl S-200.
XA50VSIII-G2	Fraksjon 2 etter separasjon av XA50VSIII på gelfiltreringskolonne Sephacryl S-200.

2. Sammendrag

Ximenia americana er en medisinske plante med mange kjente egenskaper. I Mali har den tradisjonelle medisinske bruk av *Ximenia americana* vært primært knyttet til behandling av sår. Ettersom hovedmengden av befolkningen er landbrukere er sår et stort problem i Mali. Både vannekstraktet fra rotbarken og fra stammebarken av *Ximenia americana* er rapportert å ha effekt på komplementsystemet. Det er derfor av interesse å undersøke polysakkarider fra barken av *Ximenia americana* og deres immunmodulerende aktivitet.

Tørkede pulverisert bark fra *Ximenia americana* var tidligere ekstrahert med diklormetan og metanol for å fjerne lavmolekylære og upolære substanser (utført av Atle Haugen 2009). Plantematerialet ble ekstrahert med 50 % etanol for å få fjernet lavmolekylære substanser, som var litt vannløselige. Videre ble plantematerialet ekstrahert med 50 °C og 100 °C vann for å få isolert polysakkaridene fra dette plantematerialet. Etter ekstraksjonen forelå det tre råekstrakter XA50VRÅ, XA100VRÅ og XAERÅ. Disse råekstraktene ble rensset og separert etter surhetsgrad ved hjelp av ionebytterkromatografi til nøytrale og sure fraksjoner. De sure fraksjonene XA50VSI, XA50VSII og XA50VSIII ble separert etter molekylvektstørrelse ved hjelp av gelfiltrering, og fraksjonene XA50VSI-G1, XA50VSI-G2, XA50VSII-G1, XA50VSIII-G1 og XA50VSIII-G2 forelå.

Molekylvektsdistribusjonen til de sure fraksjonene XA50VSI, XA50VSII, XA50VSIII, XA100VSI, XA100VSII og XAESI ble undersøkt ved hjelp av Superose 6 kolonne koblet til et FPLC-system. Resultatene viste at fraksjonene var polydisperse.

Monosakkaridsammensetning for fraksjonene fra gelfiltrering ble bestemt ved metanolyse, TMS-derivatisering og GC-analyse. Resultatene fra denne analysen viser at alle disse fraksjonene inneholder arabinose, rhamnose, galaktose og galakturonsyre. Disse er monosakkarider som man finner mye av i pektiner.

Bingsforhold for fraksjonene fra gelfiltrering ble bestemt etter karboksylsyre-reduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS analyse. Alle fraksjonene inneholder bindingstyper som tyder på homogalakuronan, rhamnogalakuronan I, rhamnogalakuronan II og arabinogalaktan II, men i forskjellig mengde. XA50VSIII-G1 er den eneste fraksjonen som inneholder 1,4-Gal, som tyder på at denne fraksjonen inneholder arabinogalaktan type I.

Fraksjonene XA50VSIII-G1 og XA50VSII-G1 ble enzymdegradert med arabinofuranosidase og etterfølgende separert ved hjelp av PD-10 kolonne. Både fra XA50VSII-G1 og XA50VSIII-G1 ble det samlet en fraksjon som inneholdt det forgrente området.

XA50VSI-G1, XA50VSI-G2, XA50VSII-G1, XA50VSIII-G1 og XA50VSIII-G2 viste seg å stimulere makrofagene til å frigjøre mer NO ved konsentrasjonen 100 µg/ml. Det vil si at responsen er doseavhengig. Ved konsentrasjonen 100 µg/ml viste XA50VSIII-G1 seg å ha høy aktivitet som var nesten lik aktiviteten av de positive kontrollene ved den samme konsentrasjon. Ved konsentrasjonen 10 µg/ml viste den samme fraksjonen også høy aktivitet i forhold til de andre fraksjonene.

Alle de sure fraksjonene etter ionebytterkromatografi ble testet for komplementfikserende evne. XA50VSI, XA50VSII og XA50VSIII viste lavere komplementfikserende aktivitet enn PMII, mens ingen av de andre fraksjonene viste særlig noe aktivitet. XA50VSI, XA50VSII og XA50VSIII ble vurdert å ha aktivitet. Komplementfikseringstesten ble utført også på fraksjonene etter gelfiltrering i to ganger. Den ene gangen viste bare fraksjonen XA50VSIII-G1 nesten lik fikserende aktivitet som PMII, i den andre gangen viste denne fraksjonen høyere aktivitet enn PMII. De enzymdegraderte fraksjonene ble testet for komplementfikserende aktivitet, og de viste redusert aktivitet i forhold til de native fraksjonene.

3. Innledning

3.1 Polysakkarider i tradisjonell medisin

Mange bruker fortsatt tradisjonelle urter til behandling av en rekke sykdommer. Bruken av urtemedisin er trolig spesielt viktig i steder hvor moderne medisiner er for dyre for lokalbefolkningen. Ett slikt område er Mali, der folk har lave inntekter. I alle verdensdeler kan bruk av planter bli funnet, som en del av tradisjonell medisin. I tradisjonell medisin har planter vært brukt til å behandle en rekke sykdommer inkludert sår, diaré og malaria. Moderne vitenskap har vist at mange av disse plantene inneholder polysakkarider som viser biologisk aktivitet av ulike slag. I følge Yamada var 1984 det første året da studier på et ren komplisert polysakkarid med biologisk aktivitet ble sitert i litteraturen. Videre studier av bioaktive polysakkarider ble publisert snart etter denne rapporten. De fleste studier som ble utført på biologiske aktive polysakkarider tok utgangspunkt på tradisjonelle informasjon for å velge hvilke planter som skulle studeres. Bruk av planter i sårheling og beslektede områder var blant de utgangspunktene for å studere polysakkarider av ulike planter. Forskjellige plantepolysakkarider er blitt identifisert for deres aktivitet på komplementsystemet. (Paulsen & Barsett 2005, James et al. 2007)

3.2 Polysakkarider

Polysakkarider er høymolekylære karbohydratpolymere, som består av mange enheter av monosakkarider. Disse enhetene er holdt sammen av glykosidbinger. Polysakkaridene kalles også glykaner og deles vanligvis inn i to hovedklasser, homopolysakkarider og heteropolysakkarider. Homopolysakkaridene består av en type monosakkaridenheter, mens heteropolysakkaridene består av to eller flere typer monosakkaridenheter. Polysakkaridene i begge disse klassene kan ha forskjellige sekvenser av glykosidbindinger, fordi glykosidbindingene kan ha enten α - eller β konfigurasjon og ulike posisjoner. Generelt kan polysakkaridene, altså ikke bare ha ulike sekvenser av monosakkaridenheter, men de kan også ha ulike sekvenser av glykosidbindiner. Alt dette gir mulighet for en meget høy grad av mangfold i polysakkarider og deres struktur-

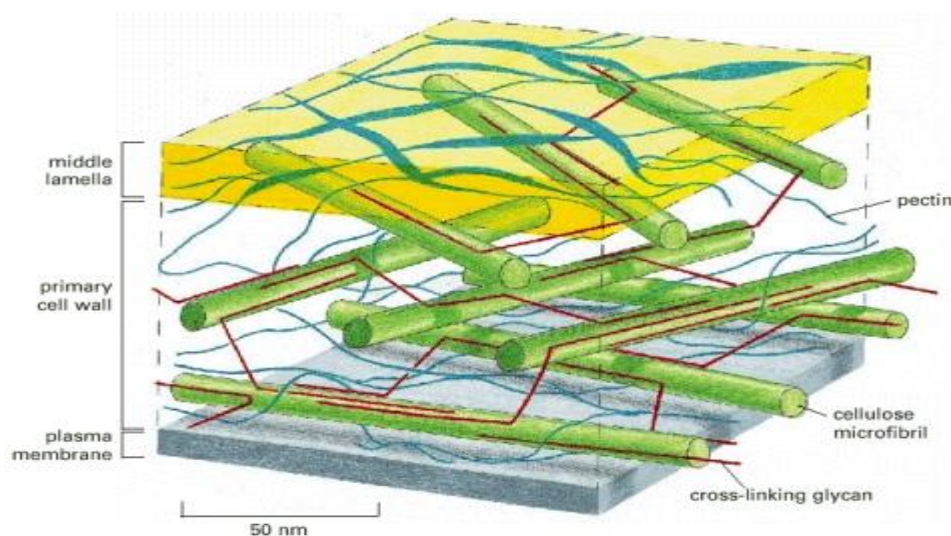
funksjonsforholder. Størrelsen på polysakkaridene kan variere. De fleste ofte forekommer som polydisperse polymere. De er polydisperse molekyler, fordi deres biologiske enzymkatalyserte produksjon skjer uten streng genetisk kontroll. Polysakkaridene er anerkjent til å ha en rekke biologiske funksjoner. De er blant annet viktige strukturelle komponenter, der de forsterker, støtter opp og stabiliserer en struktur. Dette kan ses godt i planter. (Izydorczyk 2005, Robert 1998)

3.2.1 Strukturelle polysakkarider i plantecellevegg

Alle plante celler er omgitt av en tynn, men mekanisk sterk cellevegg som gir den viktigste forskjell mellom plante celler og dyre celler. Denne celleveggen består hovedsakelig av en kompleks blanding av polysakkarider og andre polymere, samlet inn et organisert nettverk. I tillegg inneholder plante celleveggen en rekke andre komponenter, inkludert strukturelle proteiner, enzymer og fenoliske polymere. Plante celleveggen serverer en rekke av funksjoner blant annet:

- Den gir strukturelle og mekanisk støtte.
- Den binder celler sammen til vev.
- Den beskytter planten mot patogener, dehydrering og andre miljøfaktorer.

Alle plante cellevegger er generelt svært like i kjemisk sammensetning, organisering og utvikling. De er bygd opp av tre typer lag: en midtlamella, en primær vegg og en sekundær vegg (se figur 3.1). Midtlamellaen er et tynt lag av pektinrikt materiale og det sementerer sammen vegger av naboceller. Den primære celleveggen dannes i voksende celler. Dette laget er bygd opp av cellulose mikrofibriller som er støpet inn i en matriks av pektin og hemicellulose. Dette vil si at primære celleveggen består mest av polysakkarider, hovedsakelig cellulose, hemicellulose og pektiner. Den sekundære celleveggen dannes i noen celler først etter at plantecelle utvidelsen er fullført. Den er tykk og ofte lagdelt. Den består generelt av mer cellulose, mindre pektin, lignin og forskjellige typer av hemicelluloser. (Alberts et al. 2002, Taiz & Zeiger 2006)



Figur 3.1: Plantecellevegg (Alberts et al. 2002)

3.2.2 Cellulose

Cellulose er en lineær homopolymer som er bygd opp av lange skjeder av glukoseenheter. Glukoseenheterne er bundet sammen via β -1,4-bindinger. Cellulose er det vanligste naturlige polysakkarid på jorden og den finnes i plantecellevegger i alle planter. I plantecelleveggene er cellulosekjedene bundet sammen i ordnete krystallinske aggregater som kalles mikrofibriller. Cellulosekjedene i mikrofibrillene er holdt sammen med hydrogenbindinger og hydrofobe interaksjon. Disse mikrofibrillene bidrar til styrke og strukturell skjevhet av celleveggene. (Srivastava 2002, Alberts et al. 2002)

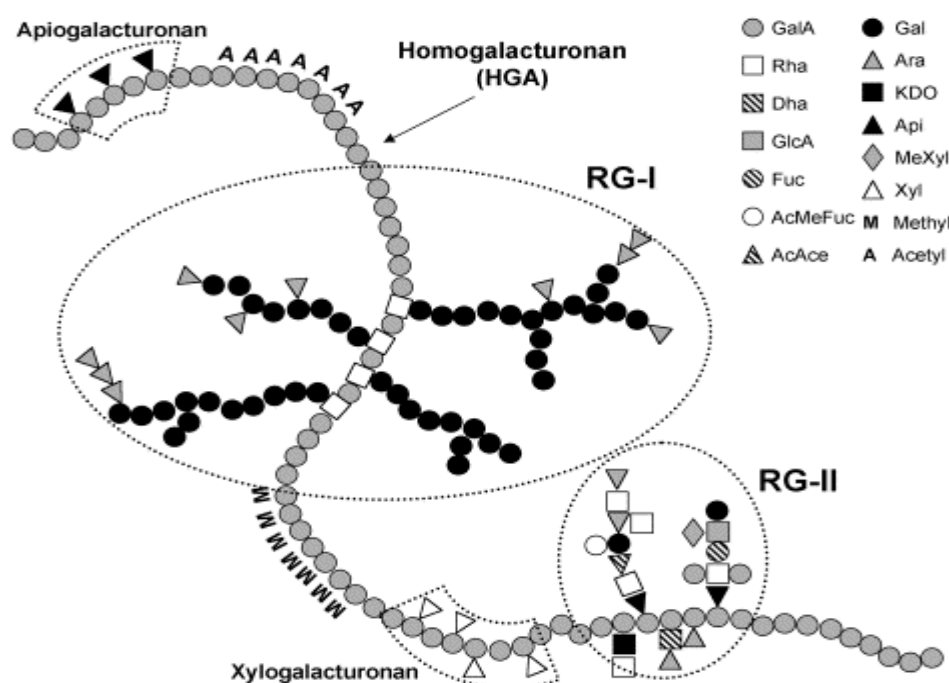
3.2.3 Hemicellulose

Hemicellulose er et generelt uttrykk for en heterogen gruppe av ikke krystallinske glukaner, som er veldig tett bundet i celleveggen. Disse fleksible polysakkaridene bindes til overflaten av cellulosemikrofibrillene og holder dem sammen i et sammenhengende nettverk. Det andre uttrykk for disse polysakkaridene/hemicellulosene er derfor kryssbindende glykaner. Forskjellige typer

av hemicellulosene finnes i plantcellevegger, og innholdet av dem varierer i vegger fra forskjellig vev og ulike arter. Hemicellulosene er generelt lettere løselige i alkalisk løsningsmiddel. (Evert & ESAU 2006, Taiz & Zeiger 2006)

3.2.4 Pektiner

Pektiner er en svært komplisert og uensartet gruppe av polysakkarider. Generelt inneholder pektiner karakteristiske områder, som antas å være kovalent knyttet til hverandre. Hovedkjeden består av homogalakturonan og rhamnogalakturonan type I, der arabinan, galaktan og arabinogalaktan kan sitte som sidekjeder på rhamnogalakturonan type I. En type II rhamnogalakturonan som er et kompleks område, kan også utgjøre en del av pektin molekylet. (Schols & Voragen, 2002, Jacob 2009)



Figur 3.2: Foreslått skjematisk fremstilling av pektin (Pérez et al. 2003)

3.2.4.1 Homogalakturonan

Homogalakturonan segmenter defineres som polymere bestående hovedsakelig av α -(1→4)-bundet galakturonsyrenheter. De kan være metylesterifisert til varierende grad.

Homogalakturonaner med en lav grad av metylesterifisering refereres til som pektinsyre (Pectinic acid), mens de med høy grad av metylesterifisering kalles for pektiner. I noen tilfeller kan homogalakturonaner også være acetyliert ved C-2 og eller C-3. Substituering med enkle xyloseenheter i posisjon-3 har også blitt reportert. Homogalakturonanene forekommer vanligvis kovalent bundet til RG-I og andre celleveggs polymere, derfor har rene homogalacturonaner vært sjelden reportert. De lange sekvenser av homogalakturonaner i pektinkomplekset kalles for glatte regioner. (Visser & Voagen 1996, Paulsen & Barsett 2005)

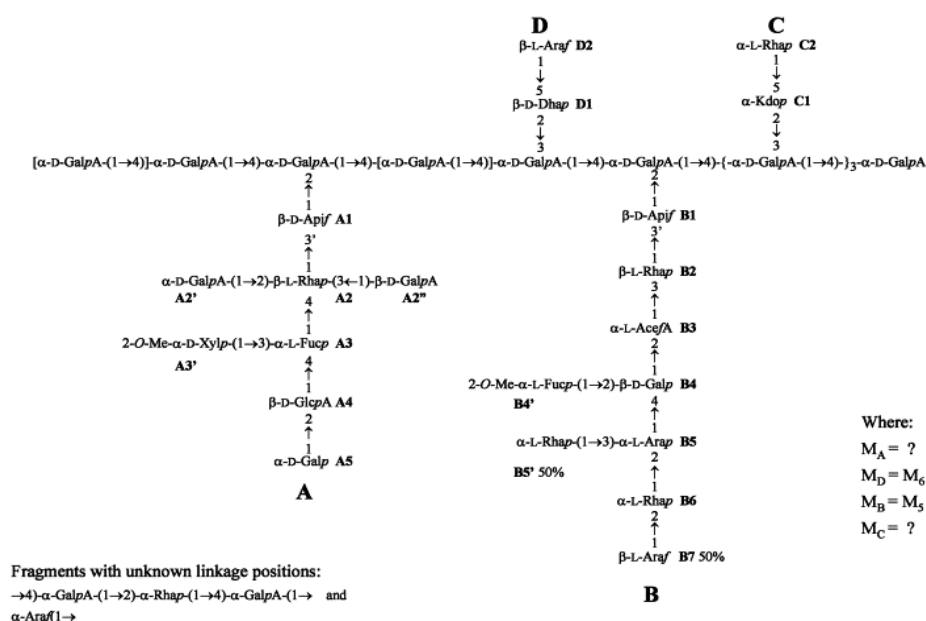
3.2.4.2 Rhamnogalakturonan I (RG-I)

Begrepet rhamnogalakturonan (RG-I) brukes vanligvis til å referere til pektinmolekylregion, som inneholder en hovedkjede av alternerende α -1,4-bundet-D-galakturonsyre og α -1,2-L-rhamnoseenheter. Rhamnoseenhetene ble ofte funnet å være forgrenet med arabinan og galaktan sidekjerder av varierende struktur. Forgreningen forekommer primært ved C-4, men også ved C-3. Dette vil si at rhamnoseenhetene er forgreningspunkter i hovedkjeden. Arabinogalaktaner som er bundet til disse rhamnoseenhetene er ofte funnet å være AG-II. AG-I ble også observert i noen tilfelle. RG-I kalles også det hårete området, på grunn av forgreningen. Ved bruk av enzymer kan man isolere RG-I fra resten av pektinet. (Paulsen & Barsett 2005, Schols & Voragen 2002)

3.2.4.3 Rhamnogalakturonan II (RG-II)

Det er anerkjent at begrepet rhamnogalakturon II brukes for en ganske karakteristisk del av pektinkomplekset i plantecelleveggen. Denne delen (RG-II) har en hovedkjede, som består av 9-10 α -1,4-bundet D-galakturonsyreenheter. Dette betyr at hovedkjeden ikke inneholder rhamnose

som navnet tilsier. Det skyldes at navnet var gitt lenge før strukturen av RG-II ble oppdaget. Fire forskjellige oligosakkaridsidekjeder er bundet til hovedkjeden via C-3 eller C-4. Disse sideskjedene inneholder sjeldne sukkerarter, som 2-O-metylfukose, apiose, aceric acid, KDO og DHA. Tilstedeværelse av disse sukkerartene som utgjør det meste karakteristisk del av RG-II. RG-II er en kompleks struktur og frem til 2003 har den samme strukturen blitt funnet i 29 forskjellige planter. (Paulsen & Barsett 2005, Visser & Voagen 1996)



Figur 3.3: Skjematisk fremstilling av RGII(Rodríguez-Carvajal et al. 2003)

3.2.4.4 Arabinaner

Alle arabinaner som stammer fra ulike plante kilder, viser de samme generelle strukturelle trekk. De består hovedsakelig av $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranosider og er vanligvis arrangert i $(1 \rightarrow 5)$ bundet skjeder. Avhengig av kildematerialet kan arabinanene være lineære eller forgrenet. Forgreninger observeres ofte ved C-3, men kan sees også ved C-2. Det er mest sannsynlig at arabinaner ikke forekommer fritt i naturen, men er vanligvis bundet til galaktaner i piktinskomplekser. De kan

frigjøres ved enzymatisk aktivitet eller svak syrehydrolyse i løpet av ekstraksjonsprosessen og dermed kan isoleres som rene arabinaner. (Paulsen & Barsett 2005, Beldman 1997)

3.2.4.5 Arabinogalaktaner

Arabinogalaktaner er en type av vannløselige polysakkarider som er bygd opp av galaktose og arabinose enheter. De er vidt spredt i hele planteriket og vises i både spiselige og uspiselige planter. Arabinogalaktanene har blitt rapportert til å ha aktivitet i mange forskjellige biologiske systemer og er derfor av interesse. De er ofte klassifisert i tre grupper: arabino-4-galaktaner (Type I), arabino-3,6-galaktaner (Type II) og polysakkarider med arabinogalaktaner sidekjeder (Type III). Type-III er omtalt som pektintype polysakkarider(pektiner).(Gullon et al 2009)

Arabinogalaktan type I (AG- I)

AG-I er bygget opp av en lineær hovedkjede som er sammensatt av 1,4-bundet β -D-galaktopyranoseenheter. Hovedkjeden er substituert på C-3 posisjon med korte sidekjeder av 1,5-bundet α -arabinoseenheter. AG-I finnes i variable grader i plantecellveggen, hovedsakelig som en bestanddel av pektinkomplekset RG-I. (Paulsen & Barsett 2005, Schols & Voragen 2002)

Arabinogalaktan type II (AG-II)

Arabinogalaktaner type II er svært forgrenet polysakkarid med en hovedkjede av β -D-galaktopyranoseenheter, som er bundet sammen enten i C3- eller C6- posisjon. Den er høyt forgrenet med 1,3,6-bundede galaktoseenheter i forgreningspunktene. AG-II er tilsynelatende mer utbredt i plantevev enn AG-I. Den er også bundet til RG-I i pektiner. Ved hjelp av så kalte Yariv-reagenset kan man lett skille mellom AG-I og AG-II. Bare AG-II har evne til å danne røde bunnfall med denne reagensen og denne metoden er ofte brukt for å påvise tilstedeværelse av AG-II i bioaktive polymerer. Både AG-I og AG-II er funnet å være bundet gjennom C4-posisjon på rhamnoseenheter av pektinkjeden. (Paulsen & Barsett 2005, Schols & Voragen 2002)

3.2.5 Strukturelltrekk til bioaktive pektintype polysakkarider

For svært lang tid har polysakkarider fra planter vært gjenstand for studier med fokus på deres fysiske egenskaper og deres anvendelse. I løpet av de siste 20 årene har det vært økende interesse i biologisk aktivitet av naturlige karbohydratpolymere. Det har blitt observert en rekke biologiske effekter fra polysakkarider, som er isolert fra medisinsplanter. Fleste av dem har vist effekt på komplement systemet. Blant de biologiske aktive polysakkaridene fra plantecelleveggen er pektiner ofte reportert. I pektintype polysakkarider som viser bioaktivitet er det presentert viss strukturelle elementer som kan ha betydning for denne virksomheten. Det ble da funnet at de fleste av disse pektintyper polysakkaridene inneholder rhamnogalakatan type I, ofte med arabinogalakatan II som sidekjeder. Arabinogalakatan I som sidekjeder er også forekommet. Tilstrekkelig vitenskapelig data mangler fortsatt for å kunne virkelig finne de bioaktive områdene av pektintype polysakkarider. Det ser ut til å være mer enn en aktiv område til å imøtekomme alle de ulike aktivitetene, som pektinene kan ha. (Paulsen & Barsett 2005)

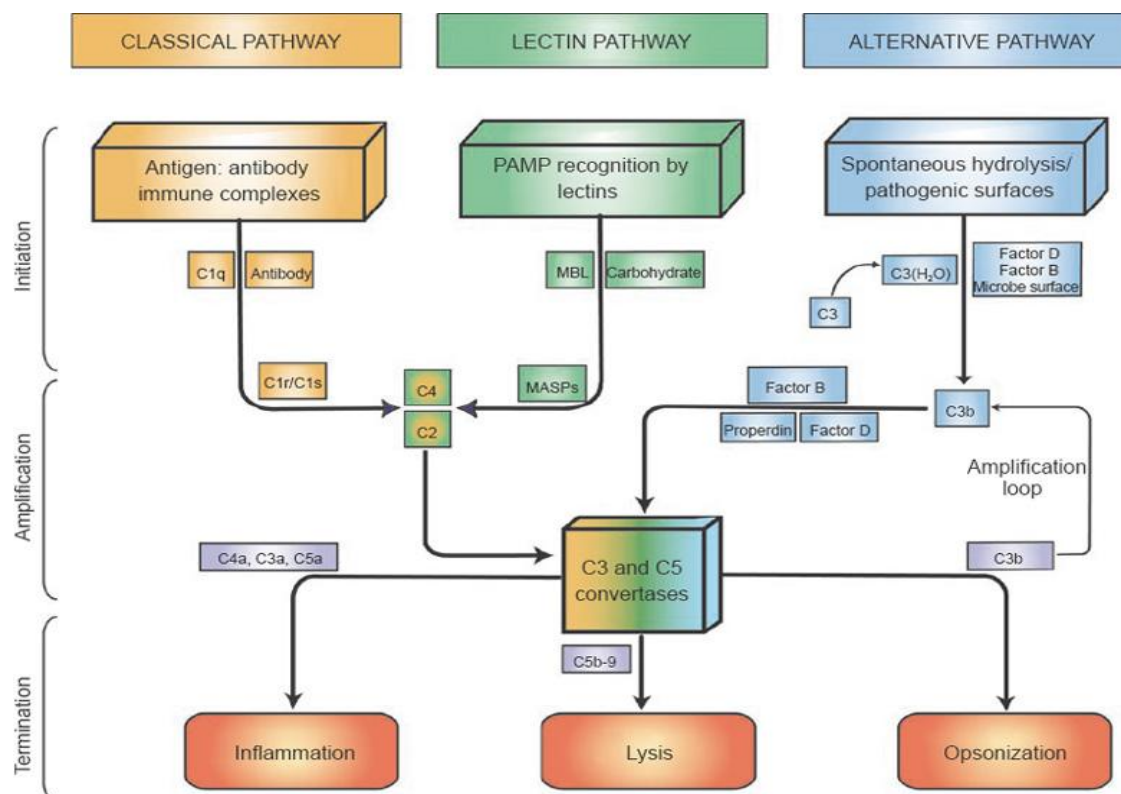
3.3 Immunmodulerende aktivitet

Forskjellige polysakkarider isolert fra en rekke medisinsplanter har vist å ha effekter på immunsystemet. De er identifisert for deres effekter på komplementsystemet. Disse er av typen arabinaner, arabinogalakataner og rhamnogalakaturonaner. Lignende typer av polymere har også vist å ha effekter på makrofager, T-lymfocytter og NK-celler. Mange av disse polysakkaridene har også en mucoadhesiv effekt. Det vil si at de har evne til å binde seg til overflaten av celler. Dette kan være årsaken til lokale virkninger, som blir sett i visse eksperimenter. (Paulsen & Barsett, 2005)

3.3.1 Komplementsystemet

Komplementsystemet er en del av det medfødte immunsystemet, og spiller en svært viktig rolle i forsvaret mot infeksjoner. Det består av over 30 proteiner, som generelt sirkulerer i sine inaktive former i plasma. Fleste av disse proteinene produseres i leveren og deretter utkilles i plasma.

Komplementsystemet fungerer i form av en enzymatisk reaksjon kaskade, slik at en aktivert komponent aktiverer det neste i kjede. Det vil si at mange komponentene av systemet fungerer som substratet av en tidligere komponent og deretter som en enzym i å aktivere den etterfølgende komponenten. Komplementsystemet kan aktiveres via tre forskjellige kaskadeveier, nemlig ved den klassiske, ved den alternative og ved den lektin aktiveringsvei, som vises i figur 3.5. (Dodds & Sim 1997, Mahmoudi et al. 2008)



Figur 3.4: Aktiveringsveier av komplementsystemet (Dunkelberger & Song 2010)

De tre aktiveringsveier

- 1) **Klassisk aktiveringsvei:** Den klassiske aktiveringsveien er typisk utløst av immunekomplekser, som består av IgM eller IgG antistoffer bundet til antigen. Bindingen av det første komplementproteinet (C1) til immunekomplekset via C1q initierer denne aktiveringsveien. C1 er et stort proteinkompleks bestående av tre subenheter, C1q, C1r og C1s. Når C1q binder seg til Fc-regionen på antistoffet som er del av immunekomplekset, endres konformasjonen i C1-komplekset. Det utløser aktiveringen av C1r, som aktiverer igjen C1s. Aktivert C1s er ansvarlig for spaltning av de neste to involvert komplementkomponenter, nemlig C4 og C2. Resultatet er dannelsen av C4b2a (C3 konvertase), som spalter det neste komplement C3 til to fragmenter C3a og C3b. C3b fragment binder seg til det aktiverende C4b2a komplekset og danner C5 Konvertase som er slutten på den klassiske veien. (Morgan 2000, Mahmoudi et al. 2008)
- 2) **Lektin aktiveringsvei:** Lektin aktiveringsveien er svært lik den klassiske veien. Den settes i gang ved bindingen av mannan-bindende lektin (MBL) til karbohydratdelen på mikroorganismer. MBL binder mannose og N-acetyl glukosamine enheter på patogenscelleveggen. Dette resulterer i aktiveringen av MBL-tilknyttede serine proteaser (MASP-1 og MASP-2), som deretter spalter C4 og C2. C4b og C2a bindes sammen for å danne C4b2a. Den siste komponenten av komplementkaskaden blir tilslutt aktivert på samme måte som i den klassiske veien. (Morgan 2000, Mahmoudi et al. 2008)
- 3) **Alternative aktiveringsvei:** Den alternative aktiveringsveien, som spiller en viktig rolle i medfødt forsvar mot infeksjoner, kan operere uten antistoff eller lektin deltakelse. Denne aktiveringsveien er initiert ved spontant hydrolyse av komplementproteinet C3, som finnes i plasma. Produktet av denne spontante hydrolysen er C3 (H₂O). C3 (H₂O) bindes deretter til faktor B, som i sin tur blir spaltet av faktor D. Dette resulterer i dannelsen av en væske-fase C3 konvertase (C3(H₂O)Bb). Etter etableringen av C3 konvertase

forsetter aktiveringskaskaden i det samme spor som i de to andre aktiveringskaskadene.
(Morgan 2000, Mahmoudi et al. 2008)

Disse tre aktiveringsveiene kulminerer i dannelsen av konvertaser. Konvertaser i sin tur generer igjen tre brede effektorbaner, som får komplementsystemet til å oppfylle sine fysiologiske imperativer i host forsvar. Disse banene er lysering, fagocytose og inflammasjon.(Dunkelberger & Song 2010).

3.3.2 Makrofager

Makrofager er store immunceller, som finnes i alle typer vev og overalt i kroppen. De kommer fra benmargen og sirkulerer i blodbanene som monocytter. Når monocytene forlater blodbanen og kommer over i vevene, differensieres de videre til makrofagene. En del av makrofagene lever en mer fastsittende tilværelse og er lokalisert innenfor vev. Dette gjelder blant annet makrofagene i lever og disse kalles for Kupffer celler. Makrofagene hører til gruppen fagocytter, som har evne til å innta og ødelegge patogene. I tillegg til å fagocyttere fungerer makrofagene også som antigenpresenterende celler (APC). Etter at antigenet er tatt opp av makrofagen, blir det bryt ned til mindre fragmenter. Disse blir deretter transportert til overflaten av makrofagen, bundet med MHC klasse II proteiner. På overflaten vil en T-celle reseptor (TCR) gjenkjenner komplekset og binder seg til det. Dette fører til frigjøring av cytokiner som vil påvirke andre celler for å aktivere en immunrespons. (Remick 1994, Madigan et al.2003)

Plantepolysakkarider er rapportert for å kunne modulere makrofagfunksjonen. Blant de observerte makrofagresponsene er økt cytotoxiske aktivitet mot tumor celler og mikroorganismer, økt produksjon av reaktive oksygenspecies (ROS) og nitrogenoksid (NO).(Schepetkin & Quinn 2006)

3.4 *Ximenia americana* L.



(Met afro, 2010)

3.4.1 Taksonomisk Klassifisering

(USDA, 2010)

Rike:	Plantae (planteriket)
Subrike:	Tracheobionta (Vaskulære planter)
Superdivisjon :	Spermatophyta (Frøplanter)
Divisjon:	Magnoliophyta (Blomstrende planter)
Klasse:	Magnoliopsida
Subklasse:	Rosidae
Orden :	Santalales
Familie:	Olacaceae (Olax familie)
Slekt :	<i>Ximenia L.</i>
Art:	<i>Ximenia Americana</i>

3.4.2 Botanikk og habitat

Ximenia americana er et tre av familien Olacaceae. Den er et lite tre, som kan bli opptil 5 meter i høyde. Den er ofte semi-parasitisk med haustoria på røttene. Det vil si at den er i stand til å ta vann og næringsstoffer fra andre planter gjennom røttene sine, men ikke er avhengig av dette. Barken har mørk brun til svakt grå farge og er glatt når er unge, men blir skjellende med alder. Bladene er mellom 3 og 8 cm lange og har 1,5-4 cm brede. De er lanseformede til elliptiske. Blomstene har grønnaktig eller hvit farge, 5-10 cm lang og er svært velduftende. Frukten har gul-rød farge og er 1,5-2,5 cm lang. *Ximenia americana* vokser på mange jordtyper, som er ofte fattige og tørre. Den er utbredt i hele tropene; Sørøst-Afrika (blant annet Mali, Senegal, og

Cambia), India og Sørøst-Asia til Australia, New Zealand, Sentral- og Sør- Amerika.(Booth & Wickens 1988, Scande & Vautier 2006)

3.4.3 Tradisjonell bruk av *Ximenia americana*

Ximenia americana er en medisinsplante med diverse tradisjonelle bruksområder, der alle deler av planten er brukt. Oljen fra frø er tradisjonelt brukt for å myke opp lær, samt er brukt i kosmetikk. Bark, røtter og blader er brukt i lokale medisin til å behandle lidelser som spedalskhet, feber, hodepine og hudplager. En infusjon av bladene er brukt som et øyvask, og benyttet også for tannverk og forstoppelse. Pulverisert barken er brukt på insektstikk som fører til byller(Scande & Vautier 2006, Inngjerdingen et al. 2004)

I Mali er planten tradisjonelt brukt mot sår. Sår blir behandlet med en vask med et avkok av bladene. Vask med et avkok av barken og etterfølgende anvending av pulverisert bark på sårene er også brukt. Infusjon av pulver av barken er også brukt på omskjæring sår for hemostatisk effekt. (Diallo et al. 2002)

Ximenia americana er også brukt i behandling av bakterielle sykdommer i Vest-Afrika. Pulver av røtter blir brukt på munnsår, diaré og revmatisme. (Witabouna & Kagoyire 2008)

I Nigeria har *Ximenia americana* vært tradisjonelt brukt til behandling av malaria, sår, hudinfeksjoner og hodepine. Den har vært også brukt til forkjølelse og som avføringsmiddel. Røttene er brukt til å behandle veneriske sykdommer og ødem. Roten av *Ximenia americana* i kombinasjon med roten av *Annona chrysophylla* har vært brukt til behandling av sovesyke. (Ogunleye & Ibitoye 2003, James et al. 2008)

Under etnofarmakologisk undersøkelse i regionene rundt Sibi, Dioila og Mali ble det rapportert en hel rekke indikasjoner for bruk av *Ximenia americana*. Halsinfeksjon og malaria var de hyppigste rapporterte plager, etterfulgt av dysmenoré. De mest brukte deler av planten i

behandling av disse plager var blader og røtter. Avkok og pulverisert plantematerialet var de viktigste former for forberedelser av bladene og røtter.(Grønhaug et al. 2008)

3.4.5 Tidligere forskning

Innholdsstoffer

Biologiske aktive substanser som hittil er detektert i *Ximenia americana*:

Flavonoider

De er naturlig forekommende fenoler. De har en rekke biologisk aktiviteter, som anti-inflammatorisk, antiallergisk, antibakteriell og antifungal.(James et al.2007)

Tanniner

De er en naturlig forekommende gruppe av høy polære fenoliske forbindelser. De har vært tradisjonelt brukt for beskyttelse av betente overflater i munnen og i behandling av sår og diaré.(Field & lettinga 1992, James et al. 2007)

Saponiner

De er en gruppe av naturlig forekommende triterpener eller steroid glykosider. De er ofte funnet å være biologiske aktive. (Lacaille-Dubois & Wagner 2000, James et al.2007)

Biologisk aktivitet

Det er noen få vitenskaplige undersøkelser som er publisert vedrørende *Ximenia americana*, spesielt når det gjelder farmakologiske effekter av de høymolekylære substansene i planten. På følgende er et lite utvalg av noen studier som er gjort.

Vannekstraktet av *Ximenia americana* har vist seg til å utøve en svært potent antitumor aktivitet både in vitro og in vivo. Dette utløste studier med sikte på identifisering og karakterisering av den aktive komponenten. Det ble funnet at denne effekten skyldes en type II ribosom-inaktivere protein, som kalles for ripoximin. Ripoximin består av to polypeptide kjeder, som holdes sammen av en disulphide bro. Disse to kjedene blir kalt A-og B-kjeden. A-kjeden er antatt å være en full aktiv RNA N-glykosidase, som er i stand til å hemme proteinsyntesen i en celle uten lysate. B-kjeden består da av to homologe områder, kalt 1 og 2. Denne kjeden kan binde seg til oligosakkarider på cellens overflate og resulterer i cytotoxiskitet. Effekten av rensset ripoximin in vivo antyder at ripoximin har tydelig potensial for kreftbehandling.(Voss et al. 2006)

Etanolekstrakt fra råolje av *Ximenia americana* ble testet for in vitro-aktivitet mot Gram positive og Gram negative bakterier. Ekstraktet viste antibakteriell aktivitet bare på Gram positive bakterier. Det var aktiv bare på *Enterococcus faecalis* og *Streptococcus pyogenes*. Ekstraktet viste også et lovende aktivitetsnivå mot noen antibiotika-resistente stammer av disse bakterietypene.(Koné et al. 2004)

Hydroalkoholekstraktet fra stammebarken av *Ximenia americana* viste antiviral aktivitet mot humant immunsviktvirus type 1 (HIV-1) og type 2 (HIV-2) ved konsentrasjoner som var lavere enn de som er nødvendig for å produsere cytotoxiskitet. Antivirale aktivitet mot HIV-1 var høyere enn mot HIV-2. (Asres et al. 2001)

Vannekstraktet fra stammebarken av *Ximenia americana* ble funnet å ha smertestillende aktivitet og at denne effekten skyldes tilstedeværelse av saponiner og flavonoider. (Soro et al. 2009)

Metanolekstrakter og vannekstrakter fra forskjellige deler av *Ximenia americana* ble funnet å ha antimikrobiell aktivitet. Metanolekstraktene var mer aktive enn vannekstraktene. Blant de testede organismene var *Staphylococcus aureus* den mest mottakelige bakterien. *C. Albicans* var den minste mottakelige sopp blant de testede soppene.(Omer & Elnima 2003)

I en annen studie ble ekstrakter fra blader, barken og roten av *Ximenia americana* testet mot fem typer bakterier. De ulike ekstraktene hemmet veksten av *Staphylococcus aureus* og *Klebsiella pneumoniae*. *Shigella flexneri* ble bare hemmet av metanolekstraktet fra bladene. *Salmonella*

typhi og *Escherichia coli* var ikke påvirket. Det vil si at ekstraktene ble også å ha antimikrobiell aktivitet og at denne aktiviteten kan skyldes tilstedeværelse av tanniner og flavonoider. (James et al. 2007)

Både 50 °C vannekstraktet fra rotbarken og 100 °C vannekstraktet fra stammebarken av *Ximenia americana* viste seg å ha sterk effekt på komplement systemet. De var mer aktive enn standarden PMII, der begge hadde ICH_{50} – verdier mindre enn 16 µg/ml.(Diallo et al. 2002)

Toksiske og uheldige effekter

Selv om ingen tradisjonell bruk av *Ximenia americana* som en giftig plante er rapportert i litteraturen, ble den funnet å være giftig i litteraturen. Kjernen er antatt å være rik på blåsyre.(Ababacar et al. 2005)

Det ble funnet at ekstrakter fra ulike deler (rot, blader, bark) av *Ximenia americana* viste seg å øke nivå av serumene AST (aspartate transaminase) og ALT (alanine transaminase) signifikant. Dette kunne indikere på hepatocellulært skade. Studien viste at det høyere innhold av hydrogencyanid, saponiner og oxalates i ekstrakter fra roten indikerte at ekstrakter fra roten kunne være mer giftige.(James et al. 2008)

4. Oppgavens målsetning

Det skulle utføre studier på polysakkarider fra barken til *Ximenia Americana*. Polysakkaridene skulle isoleres og testes for biologisk aktivitet relatert til immunsystemet for å få fokusert på de aktive polysakkaridene. Struktur på de aktive polysakkaridene skulle karakteriseres med hensyn på monosakkaridsammensetning og bindingsforhold. Videre skulle sammenheng mellom struktur og biologisk aktivitet undersøkes gjennom enzymatisk degradering.

5. METODER OG MATERIALER

5.1 Generelle metoder

5.1.1 Vannkvalitet

Vannet som ble benyttet i alle metoder, var destillert med Elix[®] millipore med Progard[®] 2 w/o Polyfenol filter.

5.1.2 Innveiling

Analysevekt: Sartorius Bp 1200IS

Overskålvekt: OHAUS PORTABLE Advanced, Model No. CT1200V

5.1.3 Filtrering

Membranfilter:

- Acro[®] 50A Device with 5 µm Versapor[®] Membrane (PALL Corporation)
- Acrodis[®] Syring Filter 0,45 µm Supor[®] Membrane (PALL Life Sciences)
- Acrodis[®] Syring Filter 0,22 µm Supor[®] Membrane (PALL Life Sciences)

Filter paper: Whatman Qualitative 15 cm (Schleicher & Schuell)

Prosedyre:

Filtrering av store vaskemengder ble utført med nutsj og vakuumsugeoppsats. Sprøyte og filterenhet ble benyttet ved små væskemengder.

5.1.4 Sentrifugering

- Heraeus Multifuge 4KR (FI)
- Heraeus Multifuge 3 SR (FHI)

5.1.5 Blanding av løsninger

Blanding av løsninger ble utført ved hjelp av:

- Whirlimixer (Fisons)
- MS2 Minishaker (IKA©)

5.1.6 Evakuering/fjerning av luft

Luft i løsningene ble fjernet ved å boble heliumgassen gjennom løsningene i 10-20 minutter.

5.1.7 Volumreduksjon**Prinsipp**

Ved å benytte rotavapor kan volumet på en løsning reduseres på en effektiv, rask og skånsom måte. En effektiv varmeoverføring genereres av den roterende flask. Dette gir både en rask fordamping og en jevn blanding av innholdet.

Løsningsmidlet og andre flyktige stoffer avdampes og løsningen oppkonsentreres. (BÜCHI Laboratechnik AG 2010)

Utstyr

- Pærekolbe
- Rotavapor (BÜCHI R-200)

Reagenser

- Den aktuelle løsningen

Prosedyre

Løsningen ble dampet inn under vakuum ved 30-40 °C

5.1.8 Ultrafiltrering

Prinsipp

Ultrafiltrering er en av de mest brukte prosesser som benytter press-drevet membranseparasjon, ved at løsningen pumpes mot membranfiltrert. Stoffer med molekylvekt på 10^3 eller større vil avvises og resirkuleres med løsningen. Generelt vil prosessvæske, oppløste salter og molekyler med lavt vekt passerer gjennom membranfilteret og ut gjennom den ene slangen. På den måten reduseres både volumet på løsningen og lavmolekylære substanser fjernes fra løsningen. (Richardson et al. 2002)

Utstyr

- Pumpe (Watson Marlow 520s)
- Filter (UltrasetteTM Omega 5K PALL Coporation suspended screen channel)

- Erlendmeyerkolber
- Slangeklemmer

Reagenser

- Destillert vann
- 0,3 M NaOH-løsning (aq) (Prolabo)
- 0,1 M NaOH-løsning (aq) (Prolabo)

Prosedyre

A. Løsningen ultrafiltreres

1. Filteret ble vasket med destillert vann over natta
2. Midtre filtratutgang stenges med en slangeklemme
3. Prøveløsningen pumpes gjennom filteret i fem minutter
4. Midtre filtratutgang åpnes forsiktig. Ut her kommer den lavmolekylære delen av løsningen, som kan samles opp i en egen kolbe eller kastes.
5. For å oppnå høyt nok trykk over filteret må den høymolekylære utgangen lukkes til med en slangeklemme. Det skal dryppe litt fra den utgangen. Den høymolekylære løsningen resirkuleres tilbake til prøveløsningen.
6. Filtreringen avsluttes når prøveløsningen har fått et passende volum.

B. Vask og oppbevaring av Ultrasette

1. Ultrasetten vaskes først med destillert vann i ca 10 minutter. Vask begge utgangene.
2. Ultrasetten vaskes så med 1L 0,3M NaOH-løsning, eller til det som kommer ut av utgangene ikke lenger er farget. Ingen resirkulering av NaOH-løsningen.
3. Ultrasetten vaskes videre med 2 L 0,3 NaOH-løsning, men nå resirkuleres løsningen.

Vask i 15 minutter.

4. NaOH-løsningen vaskes deretter bort med destillert vann til det som kommer ut av begge utgangene er nøytralt. (Kontroller med pH-papir)
5. Før oppbevaring pumpes 0,1M NaOH-løsningen inn i Ultrasetten og alle inn- og utganger stenges. Ultrasetten oppbevares ved 4 °C.

5.1.9 Syrevasking av glassutstyr

Prinsipp:

Ved syrevasking av glassutstyr vil man unngå unødvendig forurensninger, som kan påvirke karbohydratanalysene. Forurensningene kan være blant annet cellulose som kan komme fra papp- eller papiremballasje. For dette benyttes det konsentrert HCl, som vil spalte og ødelegge karbohydratforurensningene. Disse fjernes ved grundig skylling i springvann og deretter destillert vann.

Reagenser

- Konsentrert HCL
- Springvann og destillert vann

Utstyr

- Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments)
- Verneutstyr
- Begerglass

Prosedyre

1. Glassutstyret ble plassert i egnet beholder i avtrekk og fylt/dekket med konsentrert saltsyre.
2. Etter 30 minutter ble glassutstyret skylt grundig med rennende springvann og deretter med destillert vann.
3. Glassutstyret ble så tørket i varmeskap ved 80 °C i 2-3 timer.

5.1.10 Frysetørking

Prinsipp

Frysetørking er en prosess hvor vann blir fjernet fra frosne prøver ved hjelp av sublimasjon. Det vil si man senker trykk og temperatur slik at isen fordamper direkte. (Store norske leksikon 2009)

Utstyr

- Metanolbad: Hetofrig (Heto Birkerød, Danmark)
- Frysetørker: Christ ® Alpha 1-4

Prosedyre

1. Prøveløsningene ble dampet inn på rotavapor til ønsket volum der det var behov for det.
2. Prøveløsningene ble frosset ned i rundkolber under rotasjon på metanolbadet ved - 40 °C, dersom det var store volum. Ved rotasjon på metanolbadet ble det dannet et jevnt

lag av is dermed vil sublimasjonen skje mer effektivt.

3. Små volum ble satt i fryseboks i glassrør noen timer til de ble frosset.
4. Prøveløsninger i rundekolber ble frysetørket utenpå frysetørkeren, mens prøveløsninger i andre beholdere ble dekket med perforert parafilm og frystørket inne i frysetørkeren.
5. Prøvene ble tatt av frysetørkeren når de hadde nådd romtemperatur.

Normal tørketid er 24 – 48 timer.

5.1.11 Vasking av dialyseslanger

Prinsipp

Ved vasking av dialyseslangene vil eventuelle rester av cellulose fjernes.

Utstyr

- Dialyseslanger: Spectra/Por[®] Dialysis Membrane, MWCO 3,500 D: 29 mm (Spectrum Laboratorie, Inc)
- Dialyseslanger: Spectra/Por[®] Dialysis Membrane, MWCO 3,500 D: 11,5 mm (Spectrum Laboratorie, Inc)
- Stor begerglass
- Kokeplata: Wilfa
- Hansker
- Briller

Reagenser:

- 2 % NaOH (aq) (Prolabo)
- 0,05 % NaN₃ (aq) (Merck)
- Destillert vann

Prosedyre

1. Dialyseslangene ble klippet opp i ønsket lengde (50-60 cm) og skylt godt i springvann, innvendig og utvendig.
2. Slangene ble overført til 2 % oppvarmet NaOH og kokt i 10 minutter.
3. Slangene ble etter koking skylt grundig innvendig og utvendig med springvann og deretter med destillert vann.
4. Slangene ble kokt på nytt i destillert vann i 10 minutter.
5. Slangene ble så skylt med destillert vann.
6. Slangene som skulle ikke brukes med en gang ble oppbevart i 0,05 % NaN₃ ved 4 °C for å hindre bakterievekst.

5.1.12 Dialyse**Prinsipp**

Dialyse er en metode, som benyttes for å skille komponenter i en blanding i henhold til deres molekulære størrelse. Den viktige delen av dialyseprosessen er en semipermeabel membran, fordi porestørrelsen i den bestemmer hvor store molekyler som fjernes. Dialysen brukes ofte i rensing

av polysakkarider ved at salter og andre lavmolekylære forbindelser fjernes. Det er derfor prosessen noen ganger kalles for desalting. Forbindelser med lavere molekylvekt enn dialyseslangens cut off-verdi (MWCO), vil på grunn av osmotisk gradienten diffundere ut gjennom porene i slangen. For å opprettholde denne osmotiske gradienten er det viktig å skifte vannet ofte. (Houghton 1998, spektrum 2005)

Utstyr

- Ren bøtte eller stor begerglass
- Magnet og magnetrører
- Dialyseklemer
- Glasstaver
- Dialyseslanger som er vasket etter metode x.x.10

Reagenser:

- Toluen
- Mettet AgNO_3 – løsning (10 %)
- Destillert vann

Prosedyre

1. Dialyseslangene ble skylt innvendig og utvendig med destillert vann, og deretter lagt i destillert vann i 30 minutter for å fjerne rester av natriummazidløsning.

2. Slangene ble lukket ved å brette den ene enden noen ganger og deretter ble dialyseklammer satt på.
3. Slangene ble fylt med litt destillert vann for å sjekke at de var tette. Siden slangene ødelegges lett av tørrhet, ble de holdt hele tiden i kontakt med væske.
4. Slangene ble fylt med 1/2 – 2/3 fulle med prøveløsning.
5. 1-3 dråper toluen ble tilsatt som konserveringsmiddel, for å hindre mikrobiologisk vekst.
6. Luften ble presset ut fra slangene, før den åpne enden ble lukket med en merket dialyseklammer.
7. Slangene ble overført til en ren plastbøtte med destillert vann og dialysert på magnetrører ved 4°C. Glasstaver ble plassert i bøtten for å holde slangene unna magneten.
8. Dialysevannet ble skiftet flere ganger under dialysen.
9. Dialysen ble avsluttet når 2 ml av dialysevannet ikke lenger ble blakket av 1 dråpe 10 % sølvnitratløsning.

5.1.13 Absorbansmåling

Følgene apparatur ble brukt:

- Thermomax mikroplater. (komplementfikseringstest)
- BIO-RAD Model 3550 Microplate Reader (FI)

5.1.14 Måling av PH

PH-strips: Universal indicator pH 0-14 (Merck)

PH-måler: METTLER TOLEDO

5.2 Isolering og rensing av polysakkarider

5.2.1 Ekstraksjon med organiske løsemidler

Prinsipp

Plantematerialet har en for kompleks sammensetning til at det kan analyseres direkte. Plantematerialet ble derfor ekstrahert med organiske løsemidler for å få fjernet de uønskede forbindelser som vil interferere med senere polysakkaridanalyser og dermed gi uønskede resultater. Disse upolare og lavmolekylære forbindelser blir fjernet ved at plantematerialet ble ekstrahert med diklormetan og metanol. Ekstraksjon med disse organiske løsemidlene ble utført av Atle Haugen ved Farmasøytisk institutt. (Yolanda & Cui 2005)

5.2.2 Ekstraksjonen med 50 % etanol

Prinsipp

Ved ekstraksjon med 50 % etanol vil lavmolekylære forbindelser som er litt polare og som ikke løste seg i diklormetan og metanol bli ekstrahert ut nå, fordi 50 % etanol er mer polar enn disse to organiske løsningsmidler. (Yolanda & Cui 2005)

Reagens

- 50 % etanol

Utstyr

- Gryte

- Stor skje
- Termometer
- Erylenmyrkolbe, 3 liter
- Varneplate: Elektra
- Sentrifuge: Multifuge 4kr (Heraeus)
- Nutsj og vakuumsugeoppsats
- Filter paper: Whatman® Qualitative 15cm (Schleicher & Schuell)

Prosedyre

1. Plantematerialet ble overført til en gryte og tilsatt 4L 50 % etanol.
2. Plantematerialet ble ekstrahert i 2 timer ved 60 °C under omrøring. Temperaturen ble stadig kontrollert med termometer.
3. Blandingen ble sentrifugert ved 3350 rpm i 10 minutter for å få separert supernatant fra residue ordentlig.
4. Supernatanten ble dekantert av og tatt vare på.
5. Plantematerialet ble overført til den samme gryten og tilsatt 2L 50 % etanol.
6. Plantematerialet ble ekstrahert ved 60 °C i 1 time under omrøring. Temperaturen ble også kontrollert stadig ved hjelp av termometer.
7. Blandingen ble sentrifugert ved 3350 rpm i 10 min.
8. Supernatanten ble dekantert av, mens plantematerialet ble oppbevart ved 4 °C.
9. Ekstraktene(supernatantene) fra begge gangene ble slått sammen og deretter filtrert.
10. Ekstraktet ble avdampet på rotavapor (metode 5.1.7) og ble så dialysert (metode 5.1.11 og 5.1.12).
11. Ekstraktet ble satt i frysen for å unngå bakterievekst.

5.2.3 Ekstraksjon med vann ved 50 °C og 100 °C

Prinsipp

Vannet ved forskjellige temperatur er første valget som løsningsmiddel når det gjelder å isolere polare forbindelser fra plantematerialet. Dette skyldes at vannet er et polart løsningsmiddel og vil ekstrahere ut polare polysakkarider. Videre har polysakkeridene varierende grad av løselighet og vil de dermed løse seg forskjellig ved ulike temperaturer. Fraksjonene ved 50 °C og 100 °C vil innholde ulike forskjellige typer av polysakkaridene. (Izydorczyk 2005)

Reagens

- Destillert vann

Ustyr

- Gryte
- Stor skje
- Termometer
- Erlenmeyerkolbe, 3 liter
- Varneplate: Elektra
- Sentrifuge: Multifuge 4kr (Heraeus)
- Nutsj
- Filterpapir: Whatman® Qualitative 15cm?

Prosedyre

1. Plantematerialet fra metode 5.2.2 ble overført til en gryte og tilsatt 2 L destillert vann.
2. Plantematerialet ble ekstrahert i 2 timer ved 50 °C under omrøring. Temperaturen ble stadig kontrollert ved hjelp av termometer.
3. Blandingen ble sentrifugert ved 3350 rpm i 10 minutter for å få ordentlig separasjon av

supernatant fra residuet.

4. Supernatantet ble deretter dekantert av og tatt vare på, mens plantematerialet ble overført tilbake til den samme gryten.
5. Punkt 1-4 ble gjentatt.
6. Ekstraktene fra begge gangene ble slått sammen til et ekstrakt som ble deretter filtrert.
7. Ekstraktet ble redusert og lave molekulære forbindelser ble fjernet ved ultrafiltrering (metode 5.1.8).
8. Ekstraktet ble dialysert (metode 5.1.12) og ble så satt i fryseren for å unngå bakterievekst.
9. Samme prosedyre ble gjentatt ved 100 °C.

5.2.4 Ionebytterkromatografi

Prinsipp

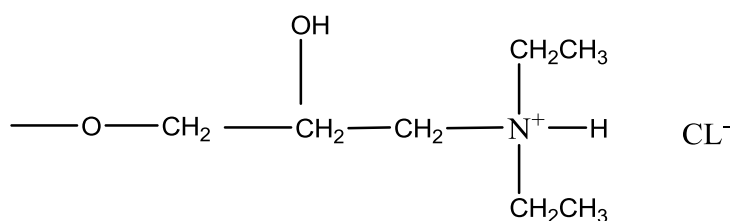
Ionebytterkromatografi er en kromatografisk metode som benyttes for å separere ioniserbare stoffer. I ionebytterkromatografi anvendes en ionebytter som stasjonærfase. En ionebytter består av en uløselig matriks av et polymert materiale eller av silka, med kovalent bundne ioniserbare eller ioniske grupper som på grunn av elektrostatisk tiltrekning har knyttet til seg motjoner med motsatt ladning. Motjonene kan byttes reversibelt ut med andre ioner fra prøve og mobilfase. Ionbyttene med kationer som motjoner kalles kationbyttene mens de med anioner som motjoner kalles for anionbyttene. Separasjonen av stoffer i en prøve forekommer ved at stoffene har ulike grad av affinitet (elektrostatisk tiltrekning) til den stasjonærfases ioniske grupper på grunn av ladningsforskjeller. (Greibrokk 2005a)

ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)

ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) er en svak anionbytter med dietylaminopropyl gruppe (ANX) bundet til sterkt kryssbundet 4% agarose (Sepharose 4 Fast Flow) gjennom kjemiske stabile eter binding. Dietylaminopropyl gruppen er kombinert på en måte som utelukker dannelse av kværtære grupper og dermed resulterer i en svak anionbytter med forskjellig selektivitet

sammenliknet med etablert svake anionbyttere. Dietylaminopropylgruppen har positiv ladning med klorid bundet til seg som motion, se figur 5.1.

Ved å benytte denne anionbytter ,vil de nøytrale og positive ladde polysakkarider elueres ut med vann som elueringsmiddel uten forsinkelse. Det vil si å strømme gjennom ionebytterkolonnen uten å bli retardert. De negative ladde, eller sure, polysakkaridene vil binde seg med ulike affinitet til ANX og dersom det benyttes et elueringsmiddel med økende ionestyrke kan disse elueres ut, separert etter økende surhetsgrad. (GE Healthcare 2004)



Figur 5.1 Dietylaminopropylgruppen med ett kloridion

Reagenser

- Destillert vann
- 2 M NaCl (aq)
- 1M NaOH (aq)
- 1M natriumacetat pH3 (aq)
- AgNO₃ (aq)
- 0,05 % NaN₃ (aq)

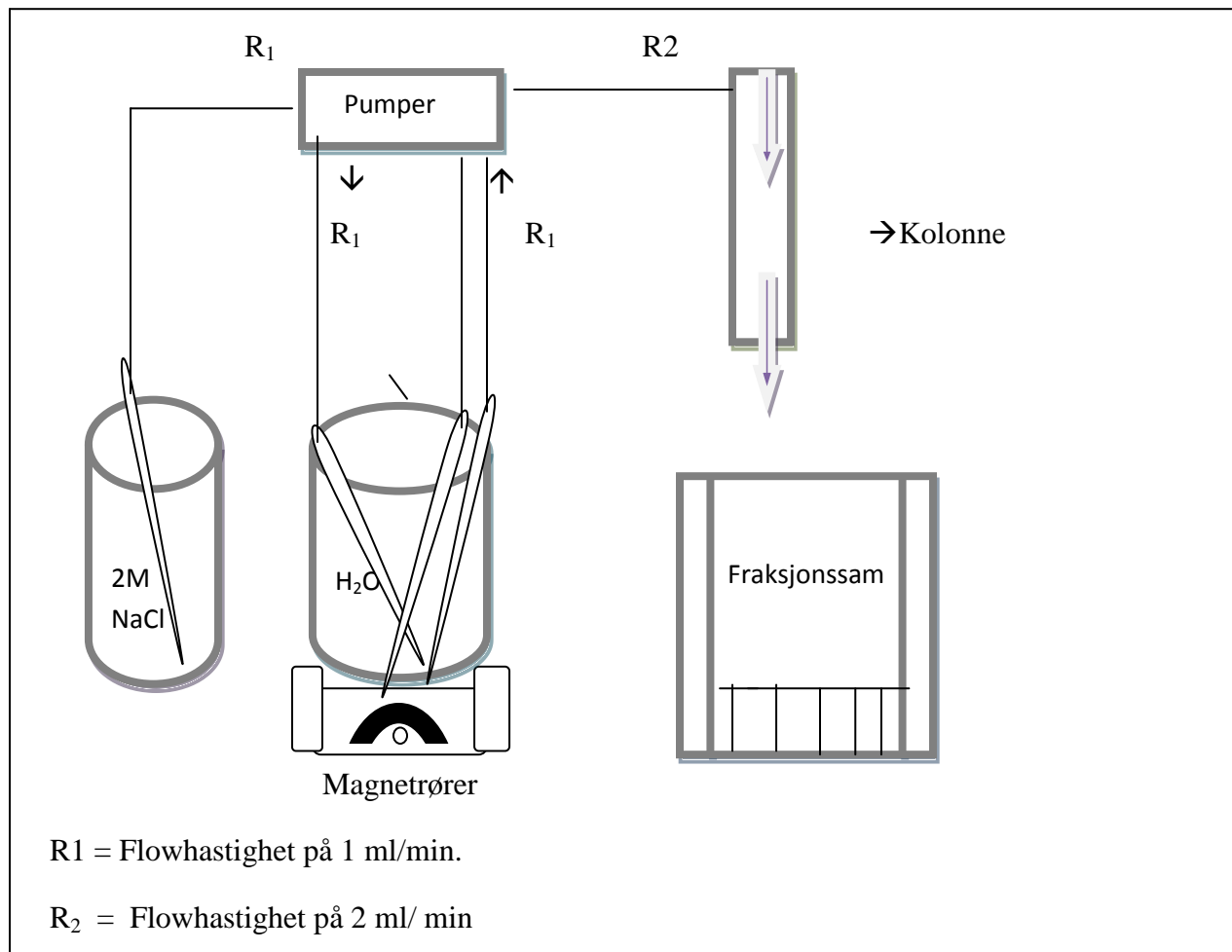
Alle løsninger som ble anvendt på kolonnen ble degasset metode 5.1.6

UTSTYR

- Kolonnenmatrix: DEAE Sepharose Fast Flow
- Kolonne: Pharmacia med h: 33 cm og radius 2,5 cm
- Kolonnevolum: ca 500 ml
- Pumpe: Perimax (Spetec)
- Fraksjonssamler: LKB-Super Frac (Pharmacia)
- Oppsamlingsrør: Sentrifugerør RB, 15 ml (Heger AS)
- Filter: Acro® 50 A Device with 5 µm Versapor® Membrane
- Sprøyte: BD plastic, 50 ml

A. Applisering og eluering av prøve

1. Kolonnen ble vasket med 3 kolonnevolum destillert degasset vann før bruk for å få fjernet konserveringsmiddel.
2. Ca 400 ml filtrert og avgasset prøve ble applisert på kolonnen med en flowhastighet på 2 ml/min.
3. De nøytrale polysakkaridene ble eluert ut med 2 kolonnevolum destillert avgasset vann og samlet i en fraksjon. Flowhastighet var 2ml/min.
4. Fraksjonen ble dampet inn (metode 5.1.7) og frysetørket (metode 5.1.10).
5. De sure polysakkaridene ble deretter eluert ut med NaCl-gradient (0-1,5M) i 9 timer. Flowhastighet fra saltløsning til blandekammer var på 1 ml/min, mens fra blandekar til kolonnen var på 2ml/min. Se figur 5.2 for oppsett av NaCl-gradient.



Figur 5.2

6. Saltgradient som ble brukt i punkt 5 ble beregnet etter følgende formel:

$$\frac{C}{T_1} = \frac{(C_0 \times R_1)}{V_0}$$

C = Konsentrasjonsgradient ved tiden T.

T = Tid forsøket skal ta.

C₀ = Utgangskonsentrasjonen i saltkammer (2M).

R = Flowhastighet fra saltkammer til blandekammer (1ml/min).

V₀ = Startvolum i blandekammer ved tiden T = 0

7. 180 fraksjoner ble samlet opp med 6 ml i hvert reagensrør på fraksjonssamler.
8. Karbohydratprofilen på disse oppsamlede fraksjonene ble bestemt ut med fenolsvovelsyre testen (metode 5.3.1).
9. Fraksjonene ble slått sammen på grunnlag av denne profilen.
10. Fraksjonene ble dampet inn (metode 5.1.7), dialysert (metode 5.1.12) og frysetørket (metode 5.1.10).
11. Kolonnen ble deretter eluert med 2 M NaCl- løsning med flowhastighet på 2 ml/min i 9 timer.
12. Punkt 7 og 8 ble gjentatt.
13. Ut fra karbohydratprofilen ble fraksjonene enten slått sammen, dampet inn, dialysert og frysetørket, eller kastet.
14. Kolonnen ble så vasket og regenerert etter B. prosedyren.
15. Prosedyren ble gjentatt til hele prøvevolumet var fraksjonert.

B. Vasking og regenerering av kolonne

Når kolonnen ikke ble veldig skitten/sterk farget, ble det vasket etter følgende prosedyren, hvor flowhastighet som benyttes var på 2ml/min:

1. kolonnen ble snudd 180 °.
2. Deretter ble det eluert med 1,5 kolonnevolum 1 M NaOH.
3. Kolonnen ble så eluert med 2 kolonnevolum 2 M NaCl for å få regenerert kolonnen med kloridioner.
4. Tilslutt ble kolonnen vasket med destillert vann helt til 2 ml eluat ikke ble blakket av 1 dråpe sølvnitratløsning. Dette ble gjort for å få fjernet overflødige kloridioner.

Når kolonnen ble veldig sterkt farget/veldig skitten, ble det i tillegg vasket med natriumacetat.

Prosedyren ble da som følger:

1. Dersom kolonnens øverste lag var sterkt farget, ble det fjernet med en pasteurpipette.
2. Kolonnen ble så snudd 180°.
3. Kolonnen ble deretter eluert med 1 kolonnevolum 1M natriumacetat med pH 3.
4. Kolonnen ble eluert med 1,5 kolonnevolum 1 M NaOH.
5. Kolonnen ble eluert med 1,5 1M natriumacetat med pH3.
6. Kolonnen ble regenerert med 1,5 kolonnevolum 2M NaCl.
7. Kolonnen ble tilslutt vasket med destillert vann helt til 2 ml eluat ikke ble blakket av 1 dråpe sølvnitatløsning.
8. For oppbevaring ble kolonnen konserverert med 0,05 % Natriumazid og lagret ved 4 °C.

5.2.5 Gelfiltrering

Prinsipp

Gelfiltrering eller gelkromatografi er en separasjonsmetode som separerer stoffer utelukkende etter deres molekylstørrelse. I denne kromatografiske metoden benyttes en stasjonærfase som består av et porøst pakkemateriale med en gitt porestørrelse. Når prøven transporteres med mobilfasen gjennom kolonnen, vil stoffmolekyler som er for store til å vandere inn i porene, bli ekskludert fra porene. De blir ført med mobilfasen mellom partiklene og elueres ut med void volum. Void volum er elueringsvolum av molekylerne som er ekskludert fra pakkematerialet. De resterende stoffmolekyler i mobilfasen vil kunne diffundere gjennom porene og vil avhengig av diffusjonsegenskaper elueres i ulike grad etter avtagende molekylstørrelse. Molekylerne som er så små at de uten restriksjon kunne trenge gjennom alle porene i pakkematerialet vil bli eluert

tilslutt. De elueres ut ved det teoretisk største elueringsvolumet som er det totale kolonnevolumet. (Greibrokk 2005 b, GE Healthcare Bio-Sciences AB 2006)

Sephacryl™ S-200 HR

Som alle Sephacryl™ HR geler består Sephacryl™ S-200 HR av et krysskobbel kopolymer av allyl dekstran og N, N-metylen bisakrylamid. Denne krysskoblingen gir en god stiv (rigid) og kjemisk stabil matriks. Den er hydrofil med minimal uspesifikk absorpsjon og masimal utvinning. Fraksjoneringsområdet er mellom 10000 og 2000000 Da for dekstraner, noe som gjør den egner seg for separasjon av polysakkarider ved gelfiltrering. Denne kromatografiske matriksen er kompatibel med alle vandige buffere fra pH 3-11. (GE Healthcare Bio-Sciences AB 2006 og 2008)

Reagenser

- Destillert vann

Utstyr

- Kolonne: XK 25 (Pharmacia)
- Kolonnematrix: Sephacryl™ S-200 HR
- Kolonnevolum: ca 467 ml (H: 100 cm, D: 2,6 cm)
- Pumpe: Perimax (Spetec)
- Fraksjonssamler: LKB-Super Frac (Pharmacia)
- Oppsamlingsrør: Sentrifugesrør RB, 15 ml (Heger AS)
- Acrodis® Syring Filter 0,45 µm Supor® Membrane (PALL Life Sciences)
- Sprøyte: BD plastikk, 10 ml

Prosedyre

1. Kolonnen ble vasket med 2 kolonnevolum destillert vann med en hastighet på 1 ml/min, før å få fjernet konserveringsmiddel.
2. Ca 1 mg prøvematerialet ble løst opp i 15 ml destillert, degasset vann og etterfølgende filtrert med 0,45 µm.
3. Prøven ble applisert på kolonnen med hastighet på 0,5ml/min.
4. Prøven ble eluert med ca 2 kolonnevolum destillert, degasset vann ved hastighet 1 ml/min.
5. 130 rør á 5 ml fraksjoner ble samlet opp.
6. Fraksjonene ble testet for karbohydratinnhold ved å benytte fenol-svovelsyretesten (metode 5.3.1), og en karbohydratelueringprofilen ble laget.
7. Fraksjonene ble slått sammen på grunnlag av denne profilen.
8. Fraksjonene ble dampet inn etter metode 5.1.7 og frysetørket etter metode 5.1.10.
9. Kolonnen tilslutt ble vasket med 1 kolonnevolum destillert vann med hastighet på 1 ml/min og deretter ble det konservert med 20 % etanol.
10. Kolonnen ble oppbevart ved 4 °C.

5.3 Kvalitativ og Kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold

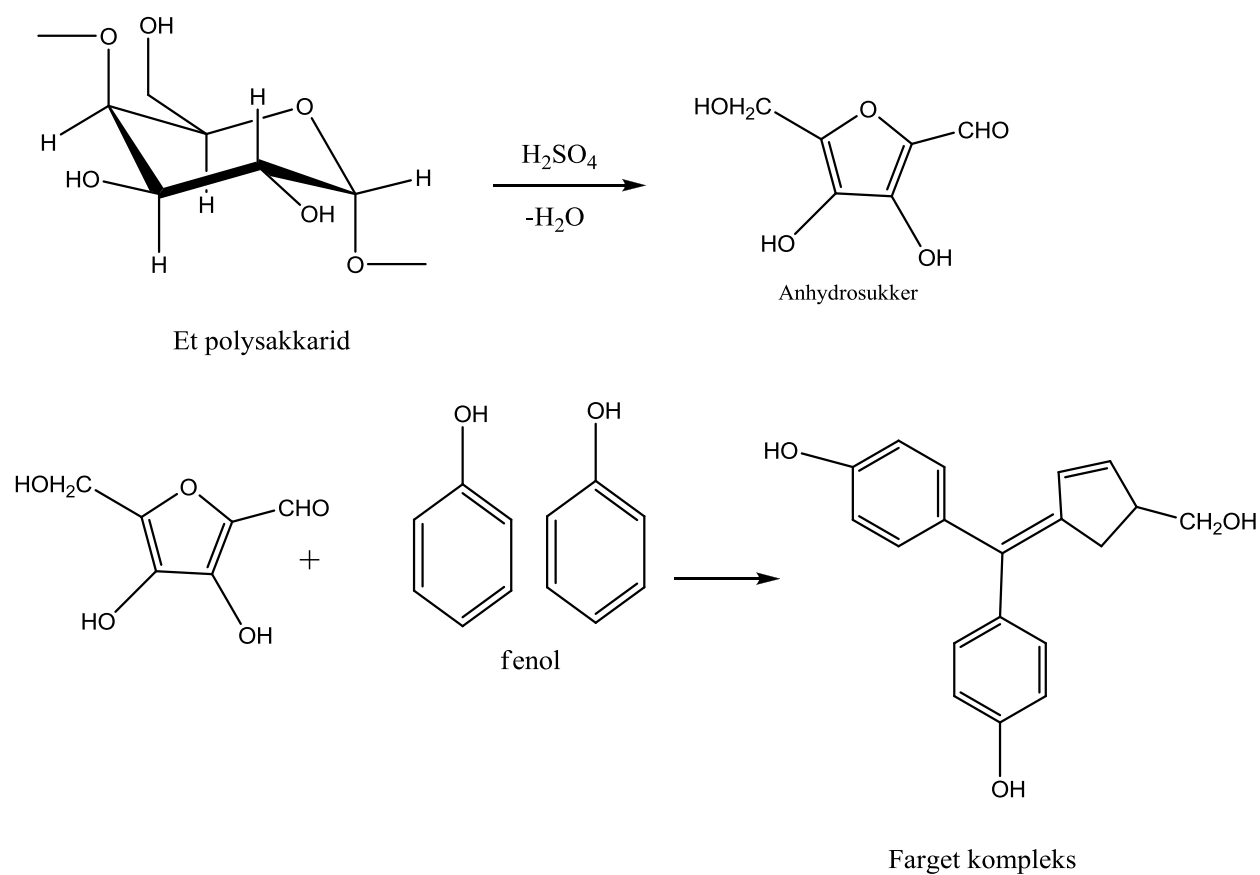
5.3.1 Fenol – svovelsyretest

Prinsipp:

Fenolsvovelsyretesten er en klassisk metode for bestemmelse av karbohydratinnhold i en løsning. Denne kloroimetriske metoden er basert på kondensering av furfuraldehyder med fenol til gullfargede komplekser. Disse furfuraldehydene er produsert ved behandling av karbohydrater med konsentrert svovelsyre. (se figur 5.3)

Komplekset som dannes, absorberer UV-lys ved 490 nm og absorbansen er proporsjonal med karbohydratinnhold i løsningen. Testen er enkel, rask, sensitivt og sikker. Disse egenskapene gjør det mulig å detektere kvantitativt selv små mengder av karbohydrater.(Brummer 2006, DuBois et al.1956, Yolanda & Cui 2005)

Karbohydratelueringprofilen blir brukt for å bestemme hvilke fraksjoner som skal slås sammen etter separasjon på kolonner.



Figur 5.3: Reaksjonsmekanisme mellom monosakkarid, fenol og svovelsyre

Reagenser

- 4 % fenol (aq)
- Konsentrert svovelsyre (Merck)
- Destillert vann

Utstyr

- Finnpiquette[®] (40-200 µl)
- Glassrør (6 ml).
- Whilimixer (Fison).
- Mikroplater med flatbunn.
- Verneutstyr.
- Mikroplateleser: BIO-RAD modell 3550.
- Gilson Microman[®] pipette 100 µl
- Gilson Microman[®] piston og spisser

Prosedyre

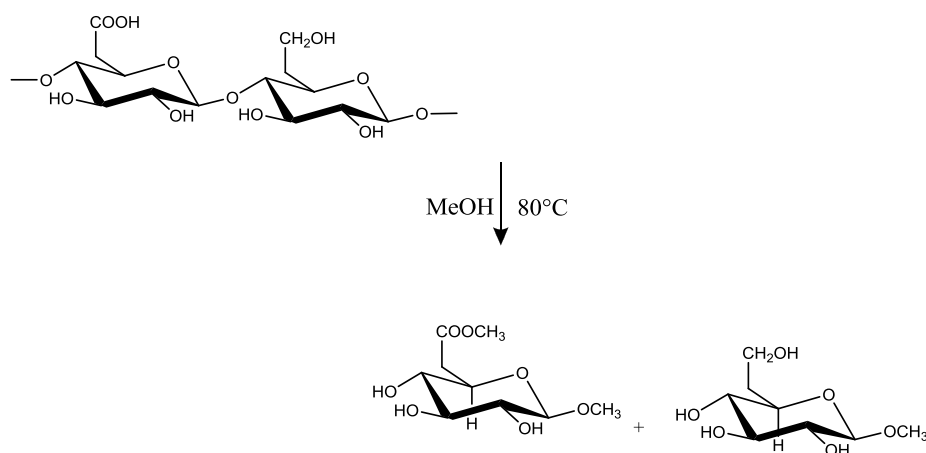
1. 100 µl av hver løsning som skulle testes ble overført til hvert sitt glassrør og tilsatt 200 µl 4 % fenolløsning og 1 ml konsentrert svovelsyre.
2. Hvert av glassrørene ble så mikset godt på whilimixer.
3. Deretter ble glassrørene satt til henstand i 30 minutter ved romtemperatur.
4. Glassrørene ble mikset kort og 100 µl fra hvert rør ble overført til hver sin brønn på mikroplaten.
5. Absorbansen ble avlest ved 490 nm.

5.3.2 Monosakkaridbestemmelse

5.3.2.1 Metanolyse

Prinsipp:

Metanolysen er første trinnet før man kan analysere monosakkaridsammensetningen i polysakkaridene. I metanolysen blir glykosidbindingene mellom polysakkaridenes monomere spaltet i surt, vannfritt metanolholdig miljø. Videre dannes det metylglykosider ved at OH-gruppene ved C1 blir metylert. Uronsyrene blir i tillegg metylesterifisert ved C6, hvor COOH-gruppene sitter, se figur 5.4. Det benyttes metanolyse i vannfritt miljø for å unngå tap av metylglykosidene. Mannitol benyttes som intern standard for å korrigere for eventuelle tap under dette trinnet. (Chambers & Clamp 1971)



Figur 5.4: Metanolyse av en glykosidbinding mellom et surt og et nøytralt monosakkaridenhet i et polysakkaridkjede

Reagens

- 4 M HCl i MeOH
- 1 ug/ul mannitol i 1 M HCl i MeOH
- Vannfri MeOH

Utstyr

- Supelco-rør med kork, som var syre vasket etter metode 5.1.9
- P₂O₅- evakuert vakuumsiktor
- Transferpettor[®], 100 µl (Brand)
- SMI- pipette (100 µl)
- Varmeskap: Functionline (Heraeus Instruments)
- Parafilm
- Nitrogengassoppsett med varmeenhet: reacti-ThermTM III Heating Module (Pierce).

Prosedyre

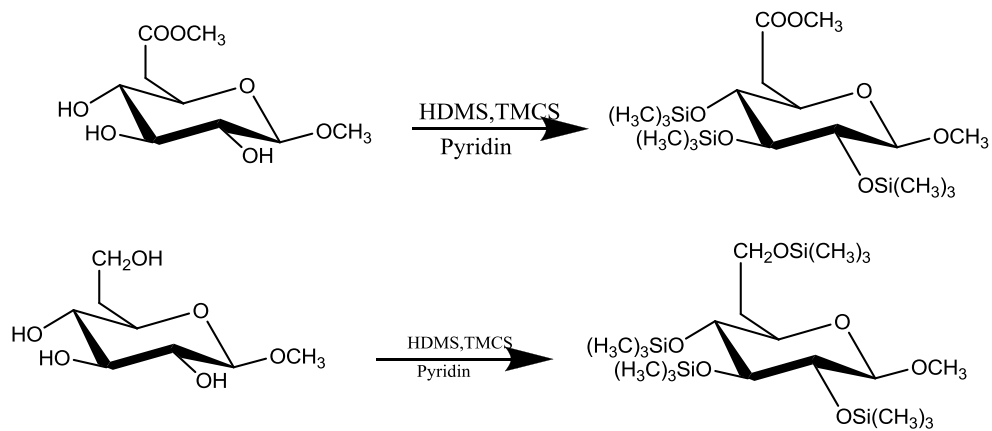
1. 1 mg frysetørket prøvemateriale ble veid inn i syrevasket supelco-rør.
2. Hvert rør ble så dekket med perforert parafilm, og det ble laget noen få små hull i perforert parafilmen ved hjelp av en kanalye.
3. Prøvene ble tørket under vakuum i P₂O₅- eksikatorene ved romtemperatur i 24 timer.
4. 1 ml 4M HCl i metanol og 100 µl 1 µg/µl mannitollosning (ca 10 % av innveid prøve) som interstandard ble tilsatt prøvene.
5. Korkene ble skrudd på før rørene ble satt i varmeskap ved 80 °C i 20-24 timer. Etter 10-15 minutter ble korkene løsnet for å slippe ut overtrykket og deretter ble de skrudd godt på for å hindre fordampingen.
6. Prøvene ble dampet til tørrhet under N₂-gass ved 40 °C.

7. 200 µl vannfri metanol ble tilsatt hver prøve, som ble dampet av under N₂-gass ved 40 °C.
8. Punkt 7 ble gjentatt 2 ganger til.
9. Prøvene ble tørket under vakuum i P₂O₅ - eksikatorene i 1 time før TMS-derivatisering.

5.3.2.2 TMS-derivatisering

Prinsipp

For å analysere stoffer ved hjelp av gasskromatografien, må de være flyktige og termiske stabile eller kan omdannes til flyktige og termiske stabile derivater. Metylglykosidene som dannes under metanolysen har polare funksjonelle grupper. Disse gruppene nedsetter metylglykosidenes flyktighet og dermed blir de mindre egnet for gasskromatografi. Dette gjelder både metylglykosidene med og uten metylestergrupper. Derivatiseringen av metylglykosidene vil eliminere problemet. Under derivatiseringen reagerer de frie hydroksylgruppene med Trimetylklorsilan og heksametyldisilazan, og det dannes TMS-derivater, se figur 5.5. Disse derivatene er termiske stabile, flyktige og velegnet til GC. På den måten vil også uønskede kolonneinteraksjonen som kan gi adsorpsjon og haledannelse unngås. (Rasmussen 2005)



Figur 5.5: TMS-derivatisering

Reagenser

- TMS-reagens:
- Trimetylklorosilan (TMCS) (Fluka) 1ml
- Heksametyldisilazan(HMDS) (Aldrich) 2ml
- Pyridin (vannfri) (Merck) 5ml

Utstyr

- SMI-pipetter (200 μl)
- Whirlimixer, Fisons

Prosedyre

1. Metanoliserte prøvene fra metanolysen (metode 5.3.21) ble tilsatt 200 µl TMS-reagens og medfølgende ble de mikset godt.
2. Prøvene ble tilsatt tilhenstand i romtemperatur i minst 30 minutter før gasskromatografisk analyse.

5.3.2.3 Gasskromatografi

Prinsipp

Gasskromatografi er utvilsomt den betydningsfulle metode for separasjon og analyse av stoffer i gassform. Dette vil si at stoffer som skal analyseres med denne kromatografiske teknikken, må være flyktige og termiske stabile. I gasskromatografi kalles mobilfasen bæregass. Bæregassen er en inert gass, både med hensyn på prøven og stasjonærfasen. Stasjonærfasen kan være et adsorpsjonsmiddel eller en ikke flyktig væske.

Prøven som er vanligvis løst opp i et flyktig løsemiddel, injiseres med en sprøyte inn i en injektor. Temperaturen i injektoren er så høy at prøven fordampes umiddelbart og blir til gass. Gassen fraktes inn og gjennom kolonnen ved hjelp av bæregassen. I kolonnen fordeler bestanddelene i gassen seg mellom stasjonærfasen og bæregassen. De som fordeler seg ulikt mellom stasjonærfasen og bæregassen, vandrer med forskjellig hastighet gjennom kolonnen og separeres.

Ved utgangen av kolonnen er det plassert en detektor som registrerer tiden de ulike stoffene bruker gjennom kolonnen. Det finnes en rekke detektorer som kan brukes i gasskromatografi. Her blir det benyttet en flammeionisasjonsdetektor som måler elektrisk strøm fra ladede partikler som

oppstår når prøven brenner i en flamme. Detektoren sender informasjon videre til integratoren og en printer skriver ut kromatogrammet med verdiene for arealet under de forskjellige toppene.

Et monosakkarid molekyl vil normalt forligge i fem forskjellige former som er i likevekt med hverandre. De forskjellige formene er åpen kjede, pyranose- eller furanoseform, a- eller b-konfigurasjon. Disse formene blir retardert ulikt på kolonnen og vil dermed gi et karakteristisk mønster av topper med bestemte retensjonstid for hver sukker i kromatogrammet. Dette kan brukes til å identifisere monosakkaridene i prøven. Det blir benyttet intern standard i prøven for å korrigere for eventuelle tap og variasjoner under prøveopparbeidelse og analyse. (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen 2004, Rasmussen 2005)

Utstyr

- Gasskromatograf: Carlo Erba 6000 Vega Series 2
- Programmeringsenhet: ICU 600
- Integrator: Chromcard
- Detektor: Flammeioniseringsdetektor (FID) MED H₂ og O₂ til flammen
- Injektor: Splitt:splittless
- Kolonnen: DB5 Fused silica kapillærkolonne (J & W scientific)
- Lengde: 30m
- Indre diameter: 0,32mm
- Filmtykkelse: 0,25 µm
- Bæregass: Helium

Betingelser for GC-systemet

- Flow: Gjennom kolonnen: 1,8 ml/min (37,6 cm/sek)
 - Splitt flow: ≈11ml/min

- Splittforhold: 1:6
 - Injiseringvolum: 0,5-1,0 µl
 - Injektortemperatur: 260 °C
 - Detektorstemperatur: 310 °C
- Temperaturprogram: 140 °C $\xrightarrow{1^{\circ}\text{C/min}}$ 170 °C $\xrightarrow{6^{\circ}\text{C/min}}$ 250 °C

Reagenser

- Pyridin (Merck)

Prosedyre

1. Først ble det åpnet for gasstrømmene, og GC og integratoren ble programmert.
2. Sprøyten ble skylt godt med pyridin.
3. 0,5-1 µl av den TMS-derivatiserte prøven ble injisert.
4. Mellom hver prøveinjeksjon ble sprøyten skylt med pyridin, også etter siste injeksjon.
5. Hele programmet tok ca 50 minutter. Tilslutt ble gassen til detektoren skrudd av etter siste kjøringen.

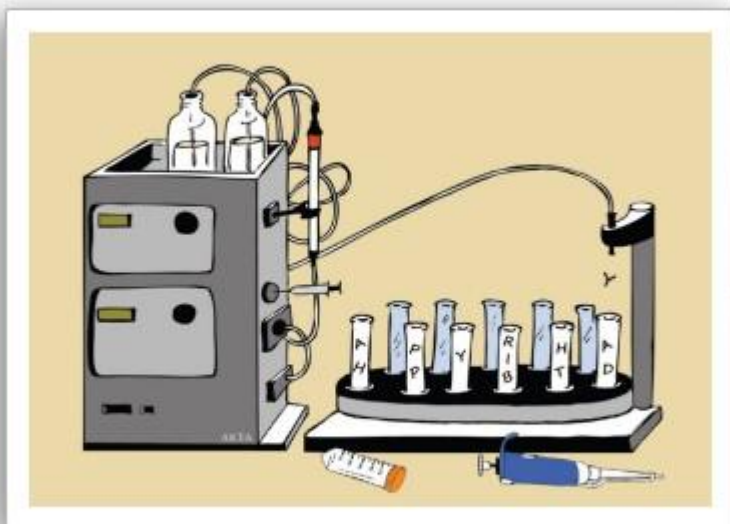
5.3.3 FPLC

Prinsipp

FPLC er et rask protein væskekromatograf, som ble opprinnelig utviklet for separasjon av proteiner. Den ble utformet for å forbedre hastigheten og oppløsningen når proteinene separeres. Denne type kromatografi har vist seg å være egnet for arbeid med polysakkarider. I dette tilfellet ble en gelfiltreringskolonne koblet til FPLC- apparaturen for å utføre en

molekylvektsdistribusjons analyse av de aktuelle ekstraktene, se figur 5.6. Kolonnen var en ferdigpakket Superose 6-kolonne. Superose 6 er en matriks bestående av svært krysskoblet agarose partikler. Den har separasjonsområde for globulære proteiner på 5-5000 kDa og når det gjelder karbohydrater er dette området vesentlig lavere. Etter separasjon på kolonnen benyttes det en UV-detektor ved 214nm.

En standardkurve ble benyttet for å finne de omtrentlige molekylvektsdistribusjoner av de forskjellige ekstraktene. Standardkurven ble laget ved hjelp av 6 dekstranstandarder med kjent molekylvekt. (Corley 2005, GE Healthcare Biosciences AB 2006)



Figur 5.6 FPLC system. (labataqa 2009)

Utstyr

- Kolonne: SuperoseTM 6 10/300 GL (Amersham Biosciences)
- Kolonnes høyde: 30,0 cm
- Kolonnen diameter: 1,0 cm
- Kolonnesvolum: 23,562 ml
- FPLC: ÄKTAFPLC (Amersham Pharmacia Biotech)
 - Dataprogram: UNICORN Version 4.00.16
 - Pumpe: P-920
 - Detektor: RID-10A, Shimadzu[®]s2
 - Skriver: REC 112
 - Monitor: UPC-900
 - Injektor: Valve INV-907
- Fraksjonssamler: Frac-900
- Oppsamlingsrør: sentrifugerør RB, 7ml (Heger As)
- Filter: Acrodisc[®] Syringe Filter 0,2 µm Supor[®] membrane (PALL Life Sciences)
- Plastsprøyter BD, 1ml
- Begerglass
- Magnet og magnetrører

Betingelser

- Elueringshastighet: 0,5ml/min
- Fraksjonssamler: 1ml per rør
- Prøvemengde: 2 mg prøve løst i 1 ml destillert, degasset vann.
Elueringsmiddel: 10 mM NaCl-løsning (Aq) (Chemie-Teknik As)

Reagenser

- 10 mM NaCl-løsning (aq)

- Destillert vann
- 20 % etanol

Prosedyre

A. Vasking og Klargjøring av kolonnen før bruk

1. Kolonnen ble vasket med destillert vann med flow på 0,2 ml/min i 1 time, deretter i 76 minutter med flow på 0,5 ml/min.
2. Kolonnen ble så klargjort med 50 ml 10mM NaCl (aq) med flow på 0,5ml/min.

B. Applisering og eluering av prøve

1. 2 mg prøvematerialet ble løst opp i 1 ml destillert vann.
2. Prøveløsningen ble filtrert 0,22 μ m
3. Ved hjelp av en sprøyte ble prøveløsningen injisert.
4. Den ble eluert ut 10 mM NaCl- løsning ved en hastighet på 0,5ml/min.
5. 22 rør à 1 0,5 ml fraksjoner ble det samlet og ved hjelp fenolsvovelsyretesten (5.3.1) ble Karbohydratelueringprofilen bestemt ut.

C. Vasking av kolonnen

1. Kolonnen ble vasket med 25 ml 0,5 M NaOH-løsning ved en hastighet på 0,5ml/min.
2. Ved samme hastighet ble kolonnen eluert med 25ml destillert vann og deretter 50 ml 10 mM NaCl.
3. Etter siste eluering ble kolonnen eluert med 20 % etanol etter destillert vann.

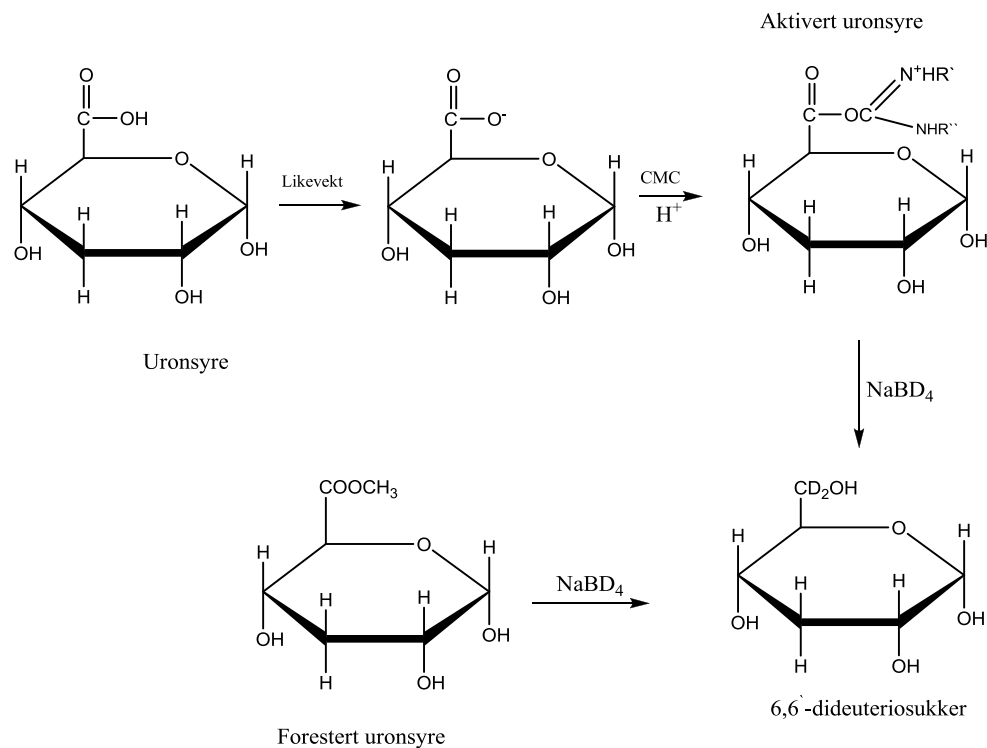
5.4 Strukturoppklaring

5.4.1 Metylering, med følgende hydrolyse, reduksjon og acetylering

5.4.1.1 Karboksylering

Prinsipp

Tilstedværelse av uronsyreenheter i polysakkaridene gjør metyleringen (5.4.1.2) mer vanskelig, fordi de kan bli degradert ved β -eliminasjon under de basiske forholdene som benyttes under metyleringen. Videre er uronsyrene generelt resistente mot syrehydrolyse, og som resultatet av dette vil viktig informasjon om bindingsmønster går tapt under analysen. Disse problemene elimineres ved å redusere uronsyrene før metylering. Ikke-forestrede uronsyrer (frie uronsyrer) må først aktivieres med vannløselig carbodiimid og deretter reduseres med NaBD₄. Forestrede uronsyrer reduseres direkte ved hjelp av NaBD₄. Både carbodiimidaktiviterte og forestrede uronsyrene reduseres til 6,6-dideuteriosukkere, som skilles under GC-MS fra de nøytrale sukker ved at de gir fragmenter med M+2. Se figur 5.7. (Cui 2005, Kim & Carpita 1992)



Figur 5.7: Aktivering og reduksjon av karboksylsyregruppe i uronsyre, og reduksjon forestret uronsyre.

Reagenser

- Destillert vann
- 0,2 M Mes (2- [N-Morpholino] etan svovelsyre) (aq) (Sigma)
- 500 mg/ml carbodiimide (1-cyclohexyl-3-(2-morpholino) carbodiimide-metho-p-toluene sulphonate) (aq) (Aldrich)
- 2 M TRIZMA (tris [hydroksymetyl] aminometan) (aq) (Sigma)
- NaBHD₄ (Natriumbordeuterid) (aq)
- 0,05 M NaOH (aq)
- Iseddik (Prolabo)

- Oktanol

Utstyr

- Rundkolber 25 ml
- Metyleringsrør med skrukork
- Glasspipetter med ballong
- Små begerglass
- Minishaker MS2, IKA[®]
- SMI-pipetter (100 µl og 200 µl)
- Dialyseslanger?
- Is

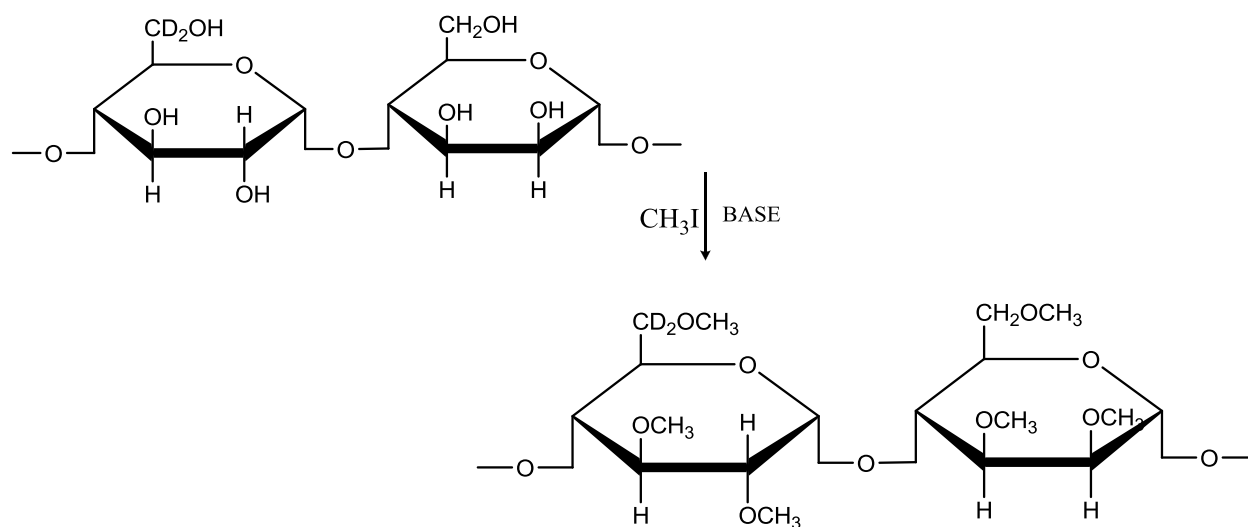
Alt glassutstyr var syrevasket etter metode 5.1.9

1. 1-2 mg av hver prøve ble løst godt i 1 ml destillert vann.
2. Deretter ble det tilsatt 200 µl 0,2 M Mes og 400 µl nylaget 500 mg/ml carbodiimide i destillert vann.
3. Løsningene ble mikset godt og inkubert i 3 timer ved 25-30 °C.
4. 1 ml 2 M TRIZMA og 4 dråper oktanol (antiskummiddel) ble tilsatt.
5. Prøvene ble så avkjølt på is.
6. Prøvene ble inkubert ved 4 °C over natta etter at 1 ml nylaget 70 mg/ml NaBD₄ i 0,05 M NaOH ble tilsatt.
7. 100 µl iseddik ble tilsatt langsam for å få fjernet overskuddet av reduktanten i prøven.
8. Punkt 7 ble gjentatt 5 ganger til sammen.
9. Prøvene ble dialysert (metode 5.1.12) og deretter frysetørket (metode 5.1.10).

5.4.1.2 Metylering

Prinsipp

Metyleringen er en standard metode som utføres for å bestemme bindingsposisjoner mellom monosakkarideenheter i polysakkaridene. Denne metoden baserer seg på at alle frie hydroksylgrupper i polysakkaridene blir fullstendig metylert. Disse er hydroksylgrupper som ikke deltar i noen glykosidbinding og på den måten kan de bli skilt fra hydroksylgrupper som inngår i glykosylbindinger. Ved metyleringen blir de frie hydroksylgruppene i polysakkaridene først ionisert til alkoksider ved hjelp av dimetylsulfoksid (DMSO) i sterkt basisk miljø. Disse er sterke nukleofile og vil metyleres med metyljodid som er metyleringsreagenset. Se figur 5.8 (Sumihiro 2008 & Aspinall 1982)



Figur 5.8 Metylering av alle frie hydroksylgrupper

Utstyr

- Transferpettor®, 50-100 µl (Brand)
- Transferpettor®, 200 µl (Brand)
- SMI Capillaries (blå)
- N₂-gassoppsett med varmeeenhet: Reacti-ThermTMIII Heating Module (Pierce)
- Glasspipetter med peleusballong
- Whirlimixer (Fisions)
- Agatmorter med pistill
- Ristestativ: Vibrax-VXR(IKA Labortechnik)
- Sentrifuge: Heraeus Multifuge 4KR
- Metyleringsrør med skrukork

Glassutstyr var syrevasket

Reagenser

- vannfri MeOH
- Dimetylsulfoksid (DMSO)
- NaOH-pellets, tørr
- Metyljodid
- Natriumthiosulfat
- Kloroform
- Destillert vann

Prosedyre

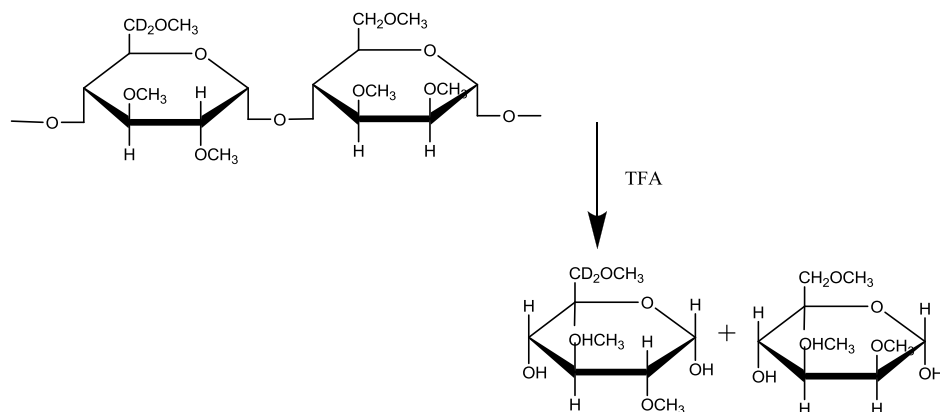
1. De frysetørket prøvene fra karboksylsyre-reduksjon (metode 5.4.1.1) ble tilsatt 500 µl DMSO og ble deretter ristet i ca 50 minutter ved 200 rpm for å få løst glykanene.

2. En suspensjon av tørre NaOH pellets knust i DMSO ble laget ved hjelp av agatmorter og pistill. Det ble benyttet 2 pellets per ml noe som gir en konsentrasjon på ca 120 mg/ml.
3. Hver prøve ble tilsatt 500 µl av suspensjonen (laget i punkt 2) ved hjelp av SMI-pipette uten å berøre glassveggene.
4. Prøvene ble satt på ristemaskin i 30 minutter ved 200 rpm etter at de ble gjennomblåst med N₂-gass.
5. Prøvene ble deretter tilsatt 100 µl metyljodid i avtrekk og ristet i 10 minutter.
6. Punkt 5 ble gjentatt.
7. Prøvene ble tilsatt 200 µl metyljodid i avtrekk og de ble videre ristet i 20 minutter.
8. Prøvene ble tilsatt 10 ml nylaget 100 mg/ml Na-thiosulfat i destillert vann og 2 ml kloroform.
9. Prøvene ble så mikset i minst 40 sekund på whirlimikser og etterpå sentrifugert i 3 minutter ved 1000 rpm for å få separert fasene.
10. Vannfasen som utgjør øverst fasen ble fjernet og kastet.
11. Den gjenværende fasen ble vasket 4 ganger med 5 ml destillert vann. Hver gang ble blandingen mikset godt og sentrifugert før vannfasen og mellomsjiktet ble fjernet med pasteurpipette. Etterpå ble den tørket under nitrogengass.

5.4.1.3 Hydrolyse

Prinsipp

Ved syrekatalysert hydrolyse spaltes glykosidbindingene mellom monomere i de metylerte polysakkaridene, mens metyl-eter bindingene holdes upåvirket. Produktene av hydrolysen blir da delvis metylerte monosakkarider. Se figur 5.9 (Cui 2005)



Figur 5.9 Hydrolyse av metylerte polysakkarider

Reagens

- 2,5 M Triklorediksyre (TFA)

Utstyr

- SMI Capillaries (blå)
- Varmeskap: Functionline (Heraeus Instruments)
- N₂- gassoppsett
- Varmeenhet for tørking under nitrogengass: Reacti-thermTM III HEATING MODULE (Pierce)
- Brand Transferpettor 100 ul (Displacement Micropipette)

Prosedyre

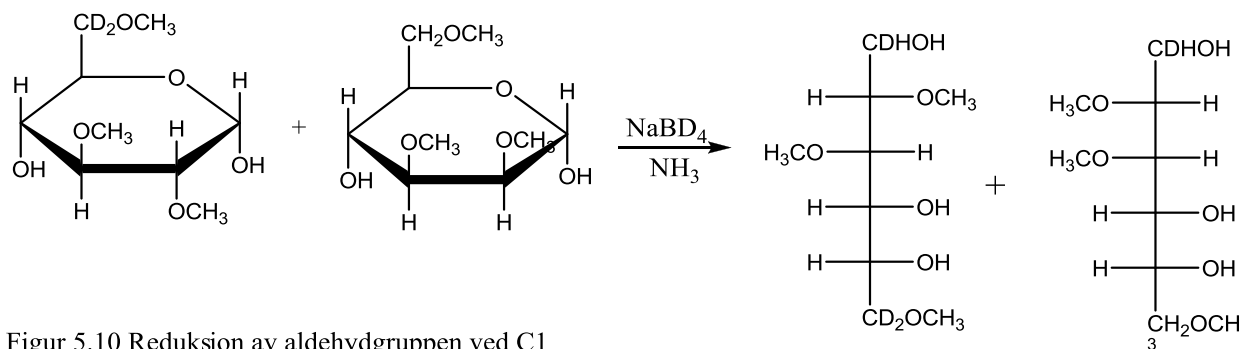
1. Metylerte prøver fra metode 5.4.1.2 ble tilsatt 500 µl 2,5 M TFA.

2. Prøvene ble så flushet med N₂-gass og satt i varmeskap ved 121 °C i 1 time.
3. Etter avkjøling ble prøvene dampet under N₂-gass til tørrhet ved ca 37 °C.

5.4.1.4 Reduksjon

Prinsipp

De delvis metylerte monosakkaridene reduseres til alditoler med natriumborodeuterid under basiske forhold. Det er syklisk hemiacetalet ved C1 som reduseres til sin primære alkohol, og dermed brytes ringstrukturen i disse monosakkaridene. Under reduksjonen introduserer natriumborodeuterid et deuterium atom ved C1 og dette gjør det lettere å skille hydroksylgruppen ved C1 fra hydrokssylgruppen ved C6 i monosakkaridet, som vises i figur 5.10 (Cui 2005)



Figur 5.10 Reduksjon av aldehydgruppen ved C1

Reagens

- 1M NaBD₄, nylaget

- 2 M NH_3
- Iseddik
- 5 % eddiksyre i metanol
- Vannfri metanol

Utstyr

- Ultrabad: Branson 220
- Transferpettor®, 50 og 100 μl (Brand)
- SMI Capillaries (grønn og blå)
- Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments)
- Glasspipetter med ballong
- N_2 -gassoppsett med varmeeinheit: Reacti-Therm™ III Heating Module (pierce)

Alt glassutstyr var syrevasket.

Prosedyre

1. De tørre prøvene fra hydrolysen (metode 5.4.1.3) ble løst i 500 μl 2 M NH_3 og tilsatt videre 500 μl nylaget 1 M NaBD_4 i 2 M NH_3 .
2. Prøvene ble sonikert på ultralydbad i 1 minutt før de ble inkubert i 1 time ved 60 °C.
3. Prøvene ble langsom tilsatt 3 x 50 μl iseddik for å få ødelagt overskuddet av reduktant. Det resulterende fizz-lyd tyder på at reduksjon var fullstendig.
4. Prøvene ble deretter tørket godt under N_2 - gass.
5. Prøvene ble tilsatt 2,5 ml 5 % eddiksyre i metanol og deretter ble de tørket godt under N_2 -gass.
6. Punkt 5 ble gjentatt.
7. Prøvene ble tilsatt 2,5 ml vannfri metanol, så ble de tørket godt under N_2 . gass. Dette vil

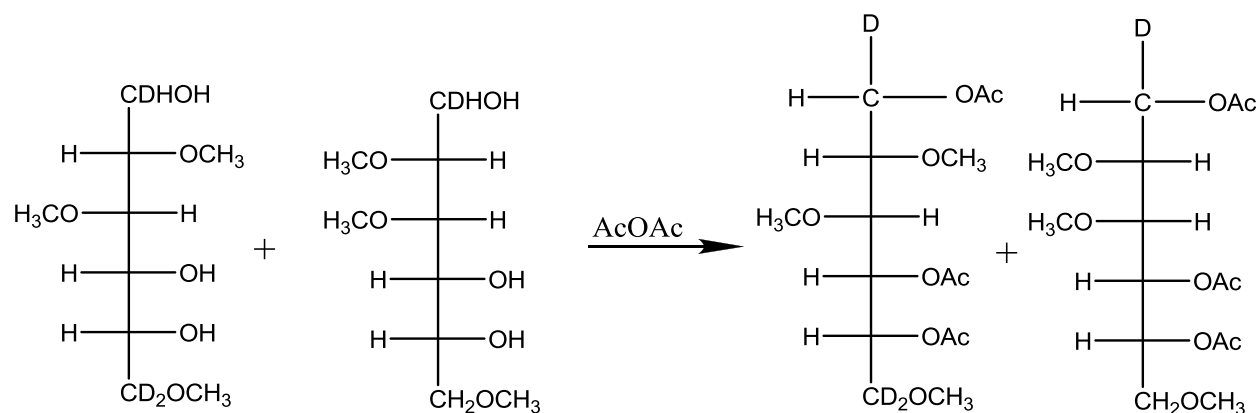
fjerne borsyre.

8. Punktet ble gjentatt.

5.4.1.5 Acetylering

Prinsipp

De frie hydroksylgruppene på de delvis metylerte alditoler acetyleres ved hjelp av eddiksyreanhydrid, og det dannes alditol-acetater, se figur 5.11. Disse er mer lipofile, samt inneholder acetylgrupper som gir bedret separasjon med GC-MS. (Cui 2005)



Figur 5.11 Acetylering med eddiksyreanhydrid

Reagenser

- 1 – metylimidazol
- Eddiksyreanhydrid

- Destillert vann
- Diklormetan (DCM)
- Vannfri metanol

Utstyr

- Glasspipetter med peleusballong
- Transferpettor®, 50 og 100 µl (Brand)
- SMI Capillaries (grønn og blå)
- Whirlimixer(Fisions)
- Sentrifuge: Heraeus Multifuge 4KR
- Metyleringsrør med skrukork
- Supelcorør med kork
- N₂-gassoppsett med varmeeinheit: Reacti-Therm™III Heating Module (pierce)

Alt glassutstyr var syrevasket.

Prosedyre

1. Prøvene fra reduksjon (metode 5.4.1.4) ble tilsatt 200 µl 1-metylimidazole, etterfulgt med 2 ml eddiksyreanhydrid.
2. Prøvene ble så mikset godt og satt til henstand i 10 minutter i romtemperatur.
3. Prøvene ble tilsatt 10 ml destillert vann for å få ødelagt overskuddet eddiksyreanhydrid.
4. Deretter ble prøvene mikset godt og satt til henstand i 10 minutter i romtemperatur.
5. De delvis metylerte monosakkaridene ble så ekstrahert med 2 x 1 ml diklormetan. For hver ekstraksjon ble prøvene mikset godt og sentrifugert i 3 minutter ved 1000 rpm.
6. Den nederste fasen/ DCM-fasen fra begge gangene ble samlet opp.
12. Ekstraktene ble tilbakevasket med 2 x 5 ml destillert vann. Hver gang ble blandingen mikset godt og sentrifugert før den øverste fasen (vannfasen) og mellomsjiktet ble fjernet.
7. Den nederste fasen fra hver ekstrakt ble videreført til hver sin Supleco-rør og tørket under nitrogengass.

8. Prøvene ble løst i 50 µl vannfri metanol og analysert ved GC-MS.

5.4.2 GC-MS

Prinsipp

GC-MS er en instrumental teknikk, som består av en gasskromatograf (GC) koblet til et massespektrometer (MS). Massespektrometeret er en massefølsom detektor, som kan gi strukturinformasjon om analyttene i tillegg til kvantitativ informasjon. I dette tilfellet blir GC-MS benyttet for å analysere de delvis metylerte alditolene. Her blir disse først separert ved passasje gjennom en gasskromatografisk kolonne, hvorefter de hver for seg elueres inn i massespektrometeret. I massespektrometeret blir molekylene bombardert av en elektronstråle under vakuum. Molekylene ioniseres og brytes ned til fragmenter. Fragmentene blir først separert etter deres masse/ladningsforhold før de blir detektert. Dette danner grunnlaget for plotting av massespektre, som viser hvilke fragmenter som dannes, og i hvilke mengder de dannes. (Bristol university, 2002-2010, Pedersen-Bjergaard & Rasmussen 2004)

GC-MS-analysene ble utført av Finn Tønnesen ved Avedling for Farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt.

Betingelser

- Flowhastighet: 1ml/min
- Injektortemperatur: 250 °C
- Temperaturprogram:
 $80^{\circ}\text{C} \text{ (5min)} \xrightarrow{20^{\circ}\text{C/min}} 170^{\circ}\text{C} \xrightarrow{0,5^{\circ}\text{C/min}} 200^{\circ}\text{C} \xrightarrow{30^{\circ}\text{C/min}} 280^{\circ}\text{C} \text{ (20 min)}$

Utstyr:

- Gasskromatograf: GC 8000 series (Fison)
- Detektor: Massespektrometer MD-800 (Fison)

- Kolonne: Factor Four VF-1MS
 - Lengde: 30m
 - Indre diameter: 0,25mm
 - Filmtykkelse: 0,25mm
- Bæregass: Helium
- Injektor: split: splitless

5.4.3 Enzym degradering

Enzymer som katalyserer spalting av polysakkarider er vanligvis helt spesifikke mot glykosidbindingskonfigurasjonen og er også svært spesifikke mot struktur og konfigurasjon av monsakkaridenhetene. Ved å benytte spesifikke enzymer er enzymdegradering en viktig metode for å undersøke mer om polysakkarider og deres biologiske aktivitet. Generelt finnes det to typer av polysakkarider-degraderingsenzymer. Ekspolysakkaridaser og endopolysakkaridaser. Endopolysakkaridaser katalyserer hydrolyse av visse glykosidbindinger innenfor polysakkaridkjeden. Det vil si de som er plassert langt nok fra begge endene. Den andre typen katalyserer spaltingen av bare terminale monosakkaridenheter på den ikke-reduserende enden av polysakkaridkjeden. I dette tilfelle benyttes det α -L-arabinofuranosidase, som vil katalysere spalting av arabinose i surt miljø. De avspaltede arabinosemolekylene separeres deretter fra resten av forbindelsen ved gelfiltrering på PD10-kolonnen for å kunne undersøke forbindelsen videre. (Bochkov *et al*, 1991)

Utstyr

- Syrevaskede Supelco-rør

- PH-måler: METTLER TOLEDO
- Whirlimixer (Fisons)
- Acrodisc® Syringe Filter 0,45 µm Supor® Membrane (PALL Life Sciences)
- Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments)

Reagenser

- α - arabinofuranosidase B, Ara-B-4002 (Megazyme)
- 50 mM natriumacetatbuffer (PH = 4)

Prosedyre

1. 5 mg frystørket prøvemateriale ble løst i 3 ml 50 mM natriumacetatbuffer i supelco-rør.
2. Prøvene ble tilsatt 30 µl α -arabinofuranosidase B og dette mikset godt
3. Prøvene ble satt i varmeskapet på 40 °C i 72 timer.
4. 9 µl av enzymet ble tilsatt på nytt til prøvene etter 36 timer.
5. Prøvene ble brakt til koking for denaturering av enzymet.
6. Deretter ble prøveløsningene avkjølt, filtrert og applisert på PD-10 kolonne (metode 5.4.3.1).
7. Prøvene ble undersøkt for komplementfikserende aktivitet med metoden 5.5.2 og karbohydratsammensetning ble undersøkt med metoden 5.3.1.1, 5.3.1.2 og 5.3.1.3.

5.4.3.1 Separering med PD-10 Desalting kolonne

Prinsipp

Den ferdigpakkete kolonnen inneholder Sephadex G-25 medium, som gir en rask gruppe separasjon av de høye molekylære substanser fra de lave molekylære substanser. Separasjon kan utføres etter to forskjellige protokoller; gravitasjon protokoll og spinn protokoll. Ved den første protokollen skjer passasje av prøven gjennom kolonnen etter tyngdekraften, mens ved andre protokollen en ekstra tyngdekraft er addert ved at kolonnen blir sentrifugert. Kolonnen benyttes vanligvis for desalting og prøveopprensing.(GE Healthcare Bio-Sciences AB 2007).

Utstyr

Kolonne: PD-10 (GE-Healthcare) diameter: 1,5 cm, høyde: 5 cm og volum: 8,3ml

Pakkemateriale: Sephadex G-25

Partikkelstørrelse: 85-260 μm

Sprøyte: BD plastikk, 10 ml

Prosedyre

1. Den øverste hetten på kolonnen ble fjernet og konserveringsmiddel ble helt ut av kolonnen.
2. Den nede enden av kolonnen ble kuttet av og kolonnen ble stilt i loddrett.
3. Kolonnen ble vasket med 25 ml destillert vann.

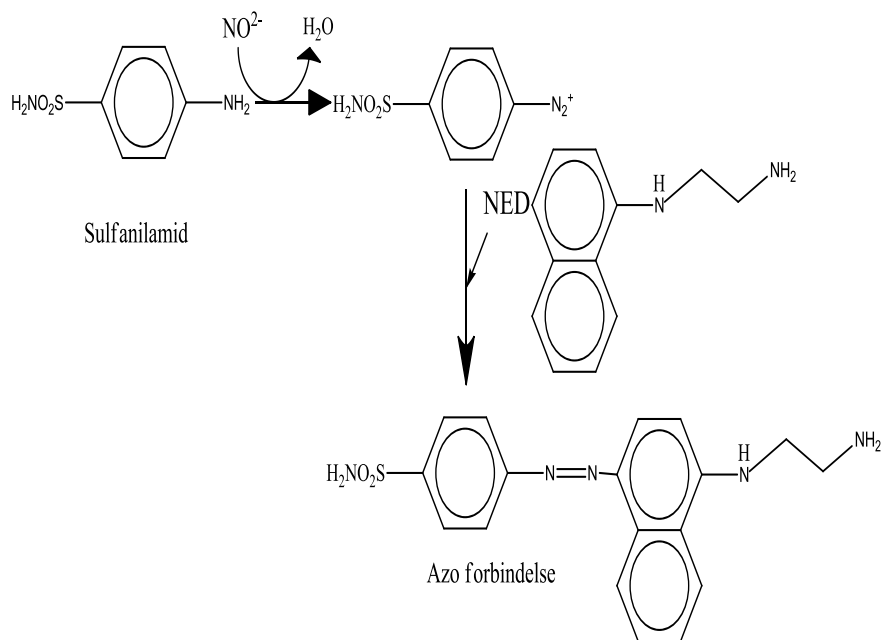
4. 2,5 ml (0,22 μm) filtrert prøvevolum ble applisert på kolonnen.
5. De høye molekulære substansene ble deretter eluert ut med 3 ml destillert vann.
6. Før en ny prøve ble applisert på kolonnen ble den vasket på nytt med 25 ml destillert vann.

5.5 Biologisk aktivitet

5.5.1 NO frigjøring fra makrofager

Prinsipp

I mange biologiske systemer er nitrogenoksid (NO) en viktig fysiologisk budbringer og effektormolekyl, spesielt i immunologisk vev. Den er en av mediatorer som makrofagene utskiller når de blir aktivert. NO brytes ned til to stabile og ikke-flyktige produkter, der nitrite (NO_2^-) er en av dem. Ved å måle (NO_2^-) kan dannelsen av NO undersøkes, og dermed makrofagaktivitet. Det vil si at nitrite er en god markør for makrofagaktivering. Det ble benyttet Griess-reagenssystemet. Griess-reagenssystemet baserer seg på dannelsen av (NO_2^-), som danner en farget azo-forbindelse ved reaksjon med sullfanilamide og N-(1-naptyl)etylendiamin i surt miljø. Kjemisk reaksjonen er vist i figur 5.12. Denne farget azo-forbindelse absorberer UV-lys og absorbans maksimum på 540 nm. (Promega Corporation 2009)



Figur 5.12: Viser kjemiske reaksjon

Reagenser

- Dyrkningsmedium: RPMI 1640 tilsatt 10 % kalveserum, 1 % penicillin/streptomycin og 2 mM L-glutamin, $5 \cdot 10^{-5}$ m 2-mercaptoetanol.
- Griess-reagens B:N(1-naptyl)etylendiamin(NED) i dest. vann
- Cellelinje: RAW 264,7 derivert fra musemakrofager.
- Positiv kontroll: LPS (lipopolysakkarid), PMII fra *Plantago major*

Utstyr

- Celleteller: Coulter[®] Particle counter (Beckman coulter)
- Sentrifuge: Rotina 420 R (Hettich)
- Celleinkubatorskap med CO-kontroll (Fprma Scientific)
- Absorbansmåler: Titertek multiskan
- Mikrotiterplater med flat og rund bunn

Prosedyre

En nitritt- standardkurve må lages for hvert assay grunnet endringer i farge.

1. Makrofager ble høstet fra cellekultur. For å telle cellene ble 20 μ l celleduspensjon tilsatt 10 ml isoton buffer II. Cellene ble telt i coulter counter.
2. Cellene ble spunnet ned ved 1300 rpm i 5 minutter.
3. Cellene ble resuspendert i dyrkingsmedium til en konsentrasjon på 500.000celler/ml.
4. En fortynningsrekke på 5mg/ml, 500 μ g/ml og 50 μ g/ml ble laget.
5. 2 μ l av hver fortynning ble satt til hver sin brønn. Det ble laget 2 paralleller av hver fortynning. Som positiv kontroller ble 2 paralleller med 5 μ l LPS (10ng/ μ l) og 5 μ l av PMII (2mg/ml) benyttet. Rent medium ble benyttet som negativ kontroll, Det ble benyttet faltebunnet mikrotiterplate.
6. Til hver brønn ble 100 μ l celleduspensjon (= 50.000 celler) tilsatt. Sluttkonsentrasjon av prøvene: 100 μ g/ml, 10 μ l/ml og 1 μ l/ml.
7. Cellene ble inkuber ved 37 °C i en celleinkubator med 4 % CO₂ i ca. 24 t.
8. Supernatanten ble overført til rundbunnet mikrotiterplate og sentrifugert ved 1400 rpm i 2 min.
9. 50 μ l av supernatanten ble overført tilflatebunnet mikrotiterplate.
10. Det ble laget en standardkurve med en fortynning av 100 mM NaNO₂(100, 50,25,12,5,6,25, 13,3, 1,56 μ m).
11. Til hver brønn ble 50 μ l Griess reagens tilsatt.
12. Platen ble satt mørkt i 10 minutter.
13. Til hver brønn ble 50 μ l Griess reagens tilsatt på nytt.
14. Absorbansen ble målt ved 540 nm.

5.5.2 Komplementfikseringstesten

Prinsipp

Komplementsystemet spiller en svært viktig rolle i det medfødte immunsystemet, som må aktiveres før det spesifikke immunsystemet kan bli aktivert. Komplementsystemet er dermed involvert i en rekke immunologiske reaksjoner og er derfor en god indikator for biologiske aktive stoffer som har immunodulerende aktivitet. For å se om polysakkarider i de ulike prøvene har noe innvirkning på komplementsystemet ble disse undersøkt ved hjelp av komplementfikseringstest. Ved denne testen benyttes det røde blodceller fra sau. Disse sensibiliseres med antistoffer mot disse cellene. Antistoffene er tatt fra en kanin. Når sauecellene sensibiliseres med disse antistoffene, dannes det immunkomplekser. Det humane komplement vil, dersom det er intakt, binde seg til disse immunkompleksene og komplementkaskaden aktiveres. Resultatet av dette er hemolysering av disse blodcellene. Polysakkaridene i prøvene får anledning til å interagere med komplementet før de antistoffsensibiliserte blodcellene tilsettes. Prøvene kan enten aktivere eller hemme komplementet og i begge tilfellene vil hemolysen av blodcellen avta. Siden både hemming og aktivering av komplementet vil medføre lavere lyseringsgrad, er det ikke mulig å slå fast med en test hvilken mekanisme som er dominerende. Ved aktivering forbrukes komplement og mindre er dermed tilgjengelig for lysering. Ved hemming av komplementsystemet er det mindre komplement tilgjengelig for lysering. dersom det ikke skjer noe med komplementet vil man få like hemolyse som i kontrollen med buffer/BSA(ca 50 %).(Dodds & Sim1997, Michaelsen 2000)

Utstyr

Finnpipetter®

Glassrør

Whilmixer

Sentrifuge: Heraeus Multifuge 3SR

Varmeskap

Risteplate

Mikrotiterplater: 96 brønner med rund bunn (NUNCTM)

96 brønner med flat bunn (NUNCTM)

ThermoMax microplate reader

Reagenser:

Destillert vann

Veronal/BSA-buffer: CFT(PH7,2) med 2mg/ml BSA

(Bovine Serum Albumin 30 %) og 0,02 % NaN_3 -løsning

Fosfatbuffer: Saltvann(PBS) pH 7,4

Blodceller fra sau: Hvit 161, tappet 6.08.2009

Antistoff: Virion 9020 Amboceptor

Komplementkilde: ECG, 14.02.2008

Standard: *Plantago major* L, fraksjon II (PMII), åpnet 19.02.2009

Prosedyre

A: Vasking av saueblodceller:

1. 100 µl saueblod per plate ble tatt ut uten å slemme blodet.
2. Blodet ble vasket to ganger med fosfatbuffer og en gang med veronal/BSA-buffer.
Blandingen ble sentrifugert i ca. 5 minutter ved 1000g mellom hver vask og Vaskevannet ble fjernet.

B: Sensibilisering av saueblodceller:

1. 5,925 ml veronal /BSA-buffer ble tilsatt 15 ul Virion 9020 Amboceptor og 60 ul vaskede blod celler.
2. Blandinger ble inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C.
3. Blodet ble vasket to ganger med fosfat og en gang med veronal/BSA-buffer. Blandingen ble sentrifugert i ca 5 minutter ved 1000g mellom hver vask og vaskvannet ble fjernet.
4. Siste gang ble vaskevannet fjernet og blodet ble fortynnet med 5,940 ml veronal/BSA-buffer, og dermed ble en 1 % løsning av blodceller laget.

C: Fortynning av prøvene og standard:

1. 1 mg prøvematerialet ble løst i Veronal/BSA-buffer eller destillert vann til en stamløsning med konsentrasjon 1mg/ml.
2. 2-folds eller fire-folds fortynningsrekke ble laget, se tabell 5.1 og 5.2 prøve.
3. Punkt 1-2 ble gjentatt for standarden

TO - folds fortynningsrekke:		
Rør nr	KONs. g/ml	
1	500	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra stamløsning.
2	250	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra rør nr 1.
3	125	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra rør nr 2.
4	62,5	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra rør nr 3.
5	31,3	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra rør nr 5
6	15,16	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra rør nr 5

Tabell 5.1: To-foldsfortynningsrekke for standard og prøvene.

Fire - folds fortynningsrekke:		
Rør nr	KONs. µ g/ml	
1	500	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra stamløsning.
2	125	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør nr 1.
3	31,25	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør nr 2.
4	7,8	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør nr 3.
5	1,95	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør nr 5
6	0,5	300 µl veronal/BSA buffer + 00 µl fra rør nr 5

Tabell 5.2: Fire-foldsfortynningsrekke for standard og prøvene.

D: Titreringskurve for komplementkilden:

1. Til 4 brønner i en rundbunnet mikroplate ble det tilsatt 100 μ l destillert vann og 50 μ l veronal / BSA-buffer til 23 av de andre brønnene.
2. Komplementet ble fortynnet med veronal / BSA-buffer som vist i tabell 5.3. 50 μ l av hver fortynning ble tilsatt til brønnene med veronal / BSA-buffer. Det ble da 3 paralleller fra hver fortynning.
3. Etter at platen ble dekket, ble den inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C.
4. Til alle brønnene ble 50 μ l 1 % SRBC tilsatt.
5. Platen ble tildekket og inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C.
6. Platen ble sentrifugert ved 1650 rpm i 5 minutter og 100 μ l fra hver brønn ble overført til en ny mikrotiterplate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering ved 1650 rpm i 5 minutter.
7. Absorbansen ble målt ved 405nm, og den fortynningen som gav ca 50% lyseringsgrad ble da bestemt.

Fortynningsoppsett for komplementkilden:		
Komplement/buffer	Komplement(μ l)	Veronal/buffer (μ l)
1:40	10	390
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890
1:100	10	990
1:110	10	1090

Tabell 5.3: Fortynningsoppsett for komplementkilden.

E: Utføring av testen:

1. Det ble tilsatt 50 μ l av hver fortynning av prøvene og standarden (2 paralleller av hver fortynning) til hver sin brønn i en rundbunnet mikrotiterplate.
2. I 4 tomme brønner ble 100 μ l destillert vann tilsatt for 100 % lysekontroll.
3. Til kontroll ble 4 andre tomme brønner tilsatt 50 μ l veronal/BSA-buffer. Som blanke-brønner for absorbanmåling ble 4 brønner tilsatt 150 μ l veronal/BSA-buffer.
4. Komplement ble tatt opp av fryseren rett før bruk, for å hindre at det ble ødelagt. Det ble fortynnet med veronal / BSA – buffer til det forholdet som ga 50 % lyseringsgrad.
5. 50 μ l av det fortynnet komplement ble tilsatt alle brønner unntatt blank-brønnene og de med vann.
6. Platen ble dekket med en bred, blank tape og satt til inkubering under risting i 30 minutter ved 37 °C.

7. Til hver brønn ble det tilsatt 50 ul sensibilisert saublodceller.
8. Platen ble dekket og inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C.
7. Platen ble sentrifugert ved 1650 rpm i 5 minutter, deretter 100 ul fra hver brønn ble overført til nye brønner i en flatbunnet mikroliterplate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering i ca 5 minutter ved 1650 rpm.
8. Absorbansen ble målt ved 405 nm.

F: Beregninger:

Lyseringsgraden for komplement ble beregnet ved hjelp av følgende formel. Den tar høyde for komplements egenpåvirkning:

$$\text{Lyseringgrad} = \frac{\text{Abs}_{\text{Kontroll}}}{\text{Abs}_{\text{vann}}} \times 100\%$$

Hemmingsgraden ble beregnet ved hjelp av følgende formel:

$$\% \text{ inhibering} = \frac{\text{Abs}_{\text{kontroll}} - \text{Abs}_{\text{prøve}}}{\text{Abs}_{\text{kontroll}}} \times 100\%$$

6. Resultater og diskusjon

6.1 Isolering av polysakkarider

Figur 6.1 Flytskjema over arbeid utført på Ximenia americana

6.1 Ekstraksjon

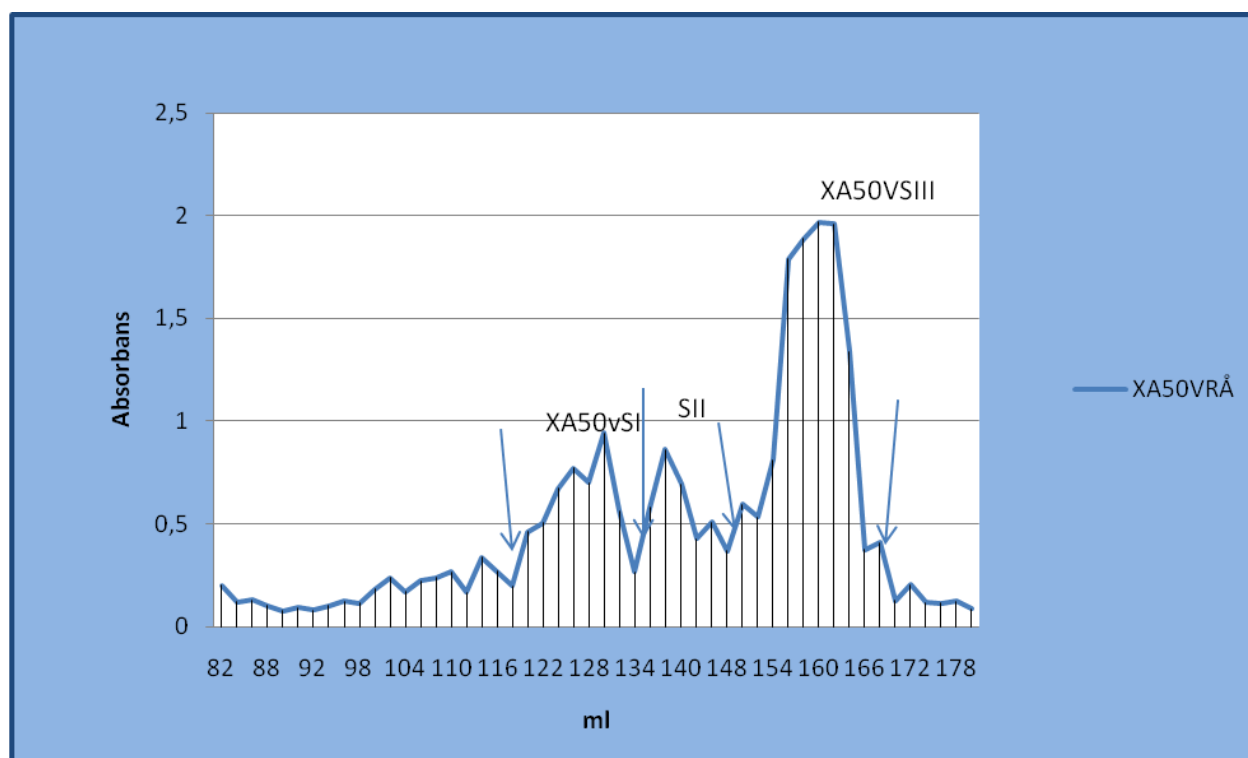
Denne oppgaven tok utgangspunkt i 350,04 g tørket plantematerialet, som var ekstrahert med diklormetan og metanol, etterfulgt av tørking. Dette ekstraksjonstrinnet var nødvendig for å få fjernet lipofile og lave molekylære forbindelser, som forekommer i plantematerialet. Trinnet var utført av Atle Haugen ved Farmasøytisk institutt. Det tørkede plantematerialet ble først ekstrahert med 50 % etanol, deretter med vann ved 50 °C og 100 °C. Råekstraktene ble kalt henholdsvis XAERÅ, XA50VRÅ og XA100VRÅ, se figur 6.1. En mørk brun farge ble observert på XAERÅ, mens på XA50VRÅ og XA100VRÅ ble det observert en gullbrun farge. Dette tyder på at det var fortsatt en del av fargestoffer i ekstraktene. Før volumreduksjon ved inndamping på rotavapor (XAERÅ) eller ultrafiltrering (XA50VRÅ og XA100VRÅ) ble alle ekstraktene dia-filtrert. Etter volumreduksjon ble disse ekstraktene dialysert og videreført til rensing og fraksjonering ved ionebytterkromatografi.

6.1.2 Ionebytterkromatografi- ANX Sepharose 4 fast flow

Ved å benytte ionebytterkromatografi ble de tre råekstraktene rensert opp, samt separert etter surhetsgrad. Hver gang ble det applisert ca 400 ml av hvert ekstrakt på kolonnen. Siden volumet på XERÅ var ca 800 ml ble det kjørt i to omganger, mens vannekstraktene (XA50VRÅ og XA100VRÅ) ble bare kjørt en gang. Det vil si at vannekstraktene var mer konsentrerte. Det var ikke mulig å oppkonsentrere etanolekstraktet ytterligere på grunn av sin viskositet. På den andre side når det gjelder ionebytterkromatografi har volumet lite å si.

De nøytrale fraksjonene ble eluert ut med destillert vann, dampet inn (metode 5.1.7) og frysetørket (metode 5.1.10). På grunn av tidligere erfaring med de nøytrale polysakkaridene ble disse nøytrale fraksjonene ikke undersøkt i kommende tester. De sure fraksjonene ble eluert ut

med en NaCl-gradient (0-1,5M). Så i tillegg til at de sure polysakkaridene ble separert fra de nøytrale polysakkaridene, ble de sure polysakkaridene også skilt fra hver andre etter ladningsstyrke. Etter eluering med NaCl-gradient, ble fraksjonene slått sammen på bakgrunn av karbohydratprofilen, som vist i figur 6.2.



Figur 6.2 Karbohydratelueringprofilen til XA50V på ANX Sepharose 4 Fast Flow, eluert med NaCl-gradient. Fraksjonene ble slått sammen i 3 fraksjoner; SI, XA50VSII og XA50VSIII på grunnlag av denne profilen.

Karbohydratprofilen ble bestemt ut ved hjelp av fenolsvovelsyre testen (5.3.1). Tre sure fraksjoner ble samlet fra XA50VRÅ, disse ble kalt for: XA50VS1, XA50VSII og XA50VSIII. Fra det andre vannekstraktet (XA100VRÅ) ble det samlet to sure fraksjoner, de ble kalt for

XA100VS1 og XA100VSII. Når det gjelder XAERÅ ble de nøytrale fraksjonene fra kjøring 1 og 2 slått sammen. Videre ble de sure fraksjonene fra kjøring 1 og 2 slått sammen, fordi de kom ut ved omtrent samme elueringsvolum. Dette resulterte i en nøytral og en sur fraksjon fra dette ekstraktet. Den sure fraksjonen ble kalt for: XAESI. Den nøytrale fraksjonen XAEN ble kastet, fordi fargen på den var gulsvart.

De sure fraksjonene ble først dialysert, fordi de inneholdte mye salt. Deretter ble de frysetørket og utbytte vises i tabell 6.1. Biologisk aktivitet for disse ble også undersøkt i tillegg til at deres molekylvektsfordeling ble bestemt.

Fraksjonene fra elueringen med 2M NaCl ble kastet, siden fenolsvovelsyre testen viste at det ikke var karbohydrater i disse. Dette tyder på at karbohydratene ble eluert ut med NaCl-gradienten.

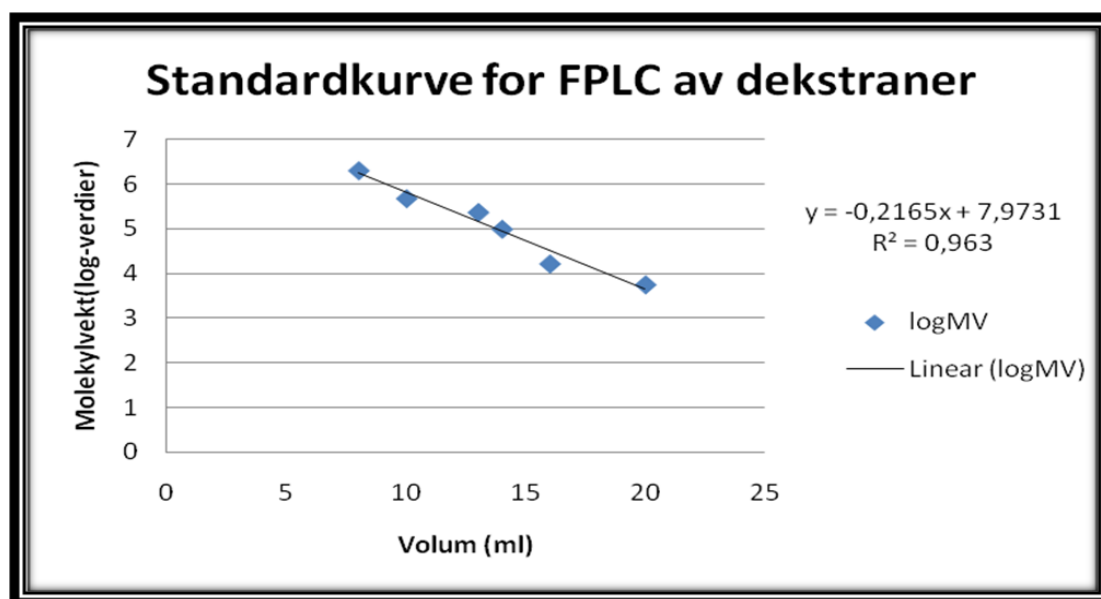
Fraksjonene	Utbytte (mg)	Utbytte (%)
XA50VSI	100,20mg	0,029%
XA50VSII	72,20mg	0,021%
XA50VSIII	73,60mg	0,021%
XA100VSI	1323,30mg	0,38%
XA100VSII	922,80mg	0,26%
XAESI	437,74mg	0,12%
XA50VN	83,60mg	0,024%
XA100VN	22,05mg	0,063%

Tabell 6.1: Ubytte av fraksjonene etter ionebytterkromatografi

6.2 Molekylvektdistribusjon

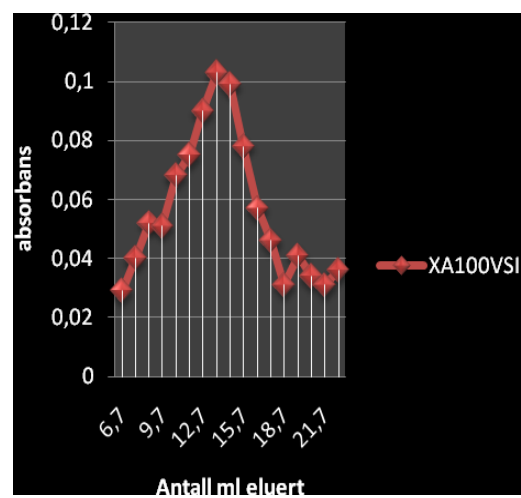
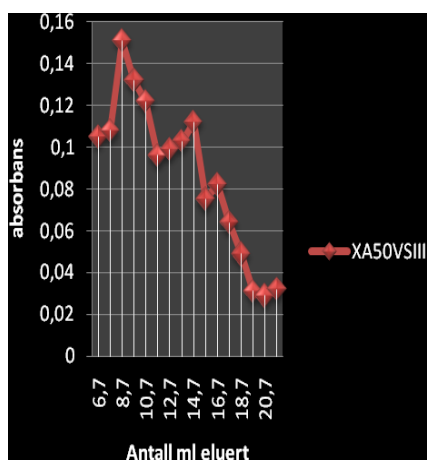
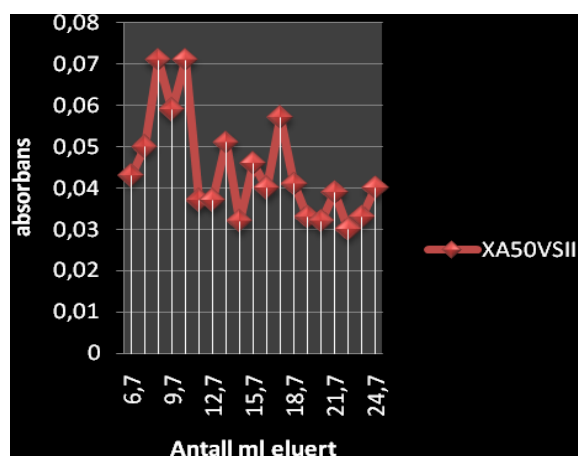
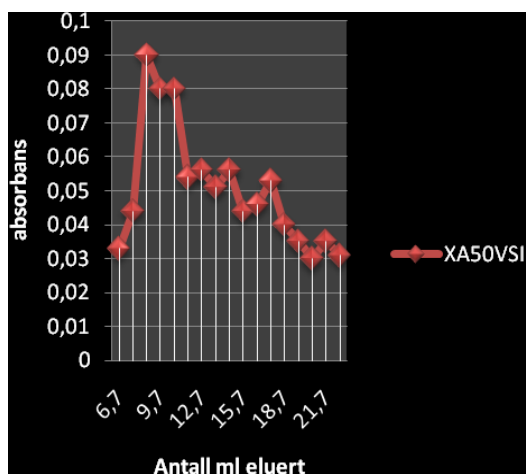
For å undersøke molekylvektdistribusjon til XAESI, XA50VSI, XA50VSII, XA50VSIII, XA100VSI og XA100VSII ble en gelfiltreringskolonne av type Superose 6 koblet til Fplc-systemet brukt. Man ønsket å estimere molekylvektfordelingen til disse forskjellige fraksjonene for å se om det var mulig å separere disse etter molekylstørrelse på en type gelfiltreringskolonne. Eventuell kunne man også bestemme hvilken type av gelfiltreringskolonne, som ville være aktuell å benytte.

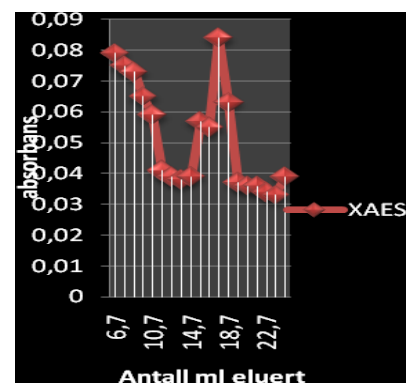
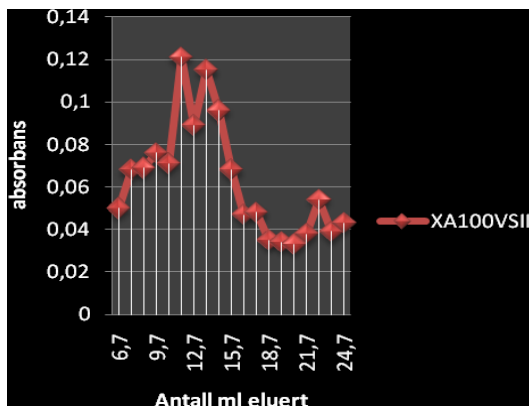
En standardkurve ble utarbeidet basert på dekstranstandarder, som var på forhånd kjørt på samme kolonne og under samme betingelser. Standardkurven ble laget ved at elueringsvolum ved toppmaksium ble plottet mot logaritmen av molekylvekten for hver av standardene. Videre ble funksjonen for en lineær regresjonslinje til kurven benyttet for å estimere molekylvektdistribusjon for disse fraksjonene. Regresjonslinjen er svært godt tilpasset til linjen, med $R^2 = 0,963$. Se figur 6.3.



Figur 6.3 Standardkurve basert på dekstraner med kjent molekylvekt.

Etter separasjon på gelfiltreringskolonnen Superose 6 ble fenol-svovelsyretesten (metode 5.3.1) brukt for å lage elueringsprofil for polysakkaridene i de ulike fraksjonene, se figur 6.4. Det avleste elueringsvolum (startpunkt, toppunkt og sluttpunkt) ble satt i regresjonslikningen fra standardkurven for beregning av molekylvektintervallene. Resultatene er som vist i tabell 6.2.





Figur 6.4: Karbohydrateuleringsprofilen for fraksjonene etter FPLC

Fraksjonstyper	Fra Mw(Da.)	Til Mw(Da.)	Hovedtopper Mw(Da.)	
			TOPP1	TOPP2
XA50VSI	453471,5	> 2000000	202352	-----
XA50VSII	8405,238	> 200000	202352	22779,8
XA50VSIII	37501,62	> 200000	1228995	61737,64
XA100VSI	1387,26	1228995	167320,8	-----
XA100VSII	37501,62	746534,7	453471,5	167320,8
XAESI	8405,238	101636,6	22779,8	-----

Tabell 6.2: De estimerte molekylvektintervallene for de respektive fraksjonene, basert på funksjonen av regresjonslinjen for standardkurven.

Fra M_w til M_w er intervallet for hele hovedtoppene. Dette intervallet skulle teoretisk strekke seg til 2000000 Da, siden molekylvekten til den største dekstranstandard som ble eluert var på 2000000 Da. Derfor blir de største estimerte molekylvektene i fraksjonene bare satt til større enn 2000000 Da i tabellen. M_w ved hovedtoppene indikerer ved hvilken molekylvekt hovedtygden av karbohydratene/ polysakkaridene ble eluert. Topp 1 til fraksjonene XA50VSI, XA50VSII og XAVSIII kom etter ca 8,2- 8,5 ml, mens topp 2 kom lengre etter. Dette kan tyde på at molekyler i disse hovedtoppene har mindre molekylvekt enn den største dekstranstandard med molekylvekt på 2000000 Da, hvor toppmaksium kom ved 8 ml. For de andre fraksjonene vil være det samme siden topp 1 kom etter ca 10 ml, se figur 6.4. Ut fra disse resultatene ble det konkludert med at disse ulike fraksjonene kunne ble separert med en type gelfiltreringskolonne, og Sephacryl™ S-200 HR var den aktuelle type.

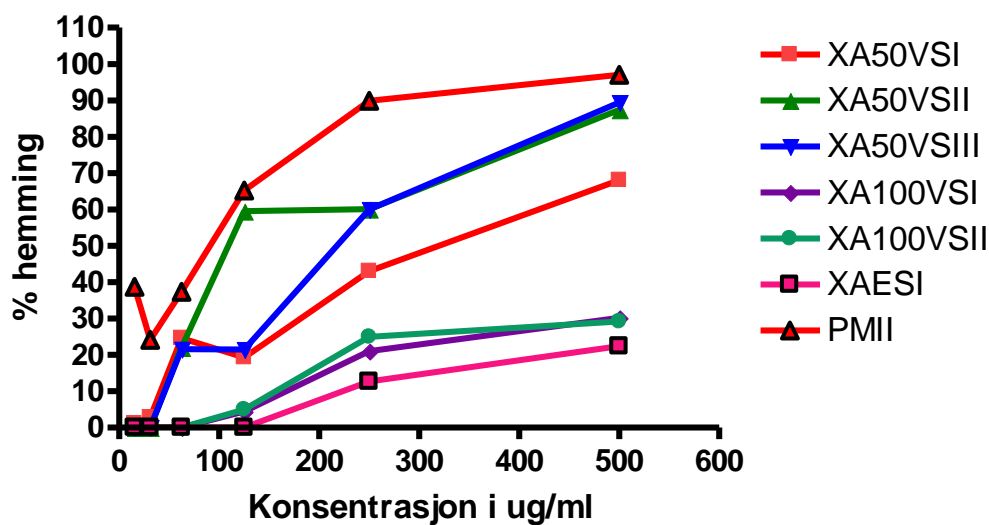
6.3 Biologisk aktivitet etter Ionebytterkromatografi

6.3.1 Resultater fra komplementfikseringstest

De fleste plantepolysakkarider isolert fra vannekstrakter er rapportert å være antikomplementære. Det vil si at de regulerer den hemolytiske aktivitet av komplement. Dette tyder på at en del av plantepolysakkarider har evne til å modulere immunsystemet ved å påvirke komplementsystemet. Evne til å modulere komplementsystemet av de ulike fraksjonene ble derfor undersøkt ved hjelp av komplementfikseringstesten. I testen måles antikomplementær effekten ved prosentvis hemming av hemolyse. Testen skiller ikke mellom aktivering eller hemming av komplement og vil dermed den antikomplementære effekten være et resultat av begge mekanismene uten at det er mulig å skille dem fra hverandre. Resultatene oppgis i ICH_{50} verdier, som er den laveste konsentrasjonen av testsubstansen som må til for å kunne gi 50 % hemming av komplementet. Da testen utføres med et biologisk system, vil de ulike komponentene variere fra gang til gang. For å korrigere for variasjonene ble det benyttet standarden PMII, som brukes som positiv kontroll. (Milchaelsen 2000, Yamada & Kiyohara 1999). For å lettere sammenligningen av aktiviteten mellom de forskjellige fraksjonene ble det benyttet relativ ICH_{50} , som er et forholdstall mellom

fraksjon- ICH_{50} og PMII-ICH_{50} . Et relativ ICH_{50} som er høyere enn 1 indikerer på at fraksjonen har lavere antikomplementære effekt enn PMII , motsatt blir dersom fraksjonen har en verdi større 1. Figur 6.6 viser det relative ICH_{50} for hver fraksjon i forhold til standarden.

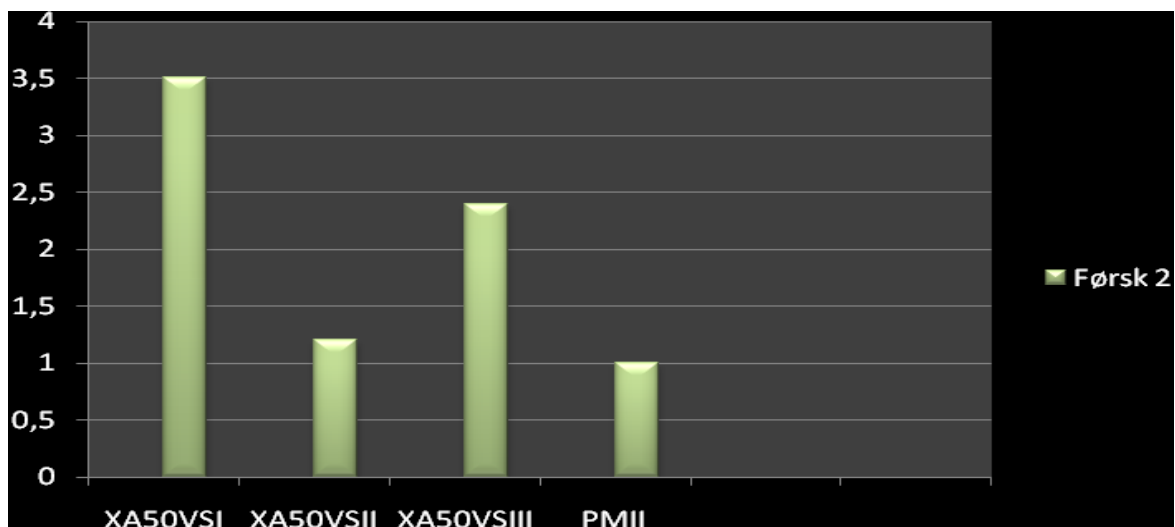
For de sure fraksjoner etter ionebytterkromatografi ble komplementfikseringstesten utført, se figur 6.5.



Figur 6.5: Komplementfikserende aktivitet til alle sure fraksjonene etter ionebytterkromatografi

	ICH ₅₀ (µg/ml)	
Fraksjoner		
XA50VSI	319,5	
XA50VSII	109,1	
XA50VSIII	217	
XA100VSI		
XA100VSII		
XAESI		
PMII	90,9	

Tabell 6.3 viser fraksjonenes ICH₅₀-verdier, som basert på figuren 6.5.

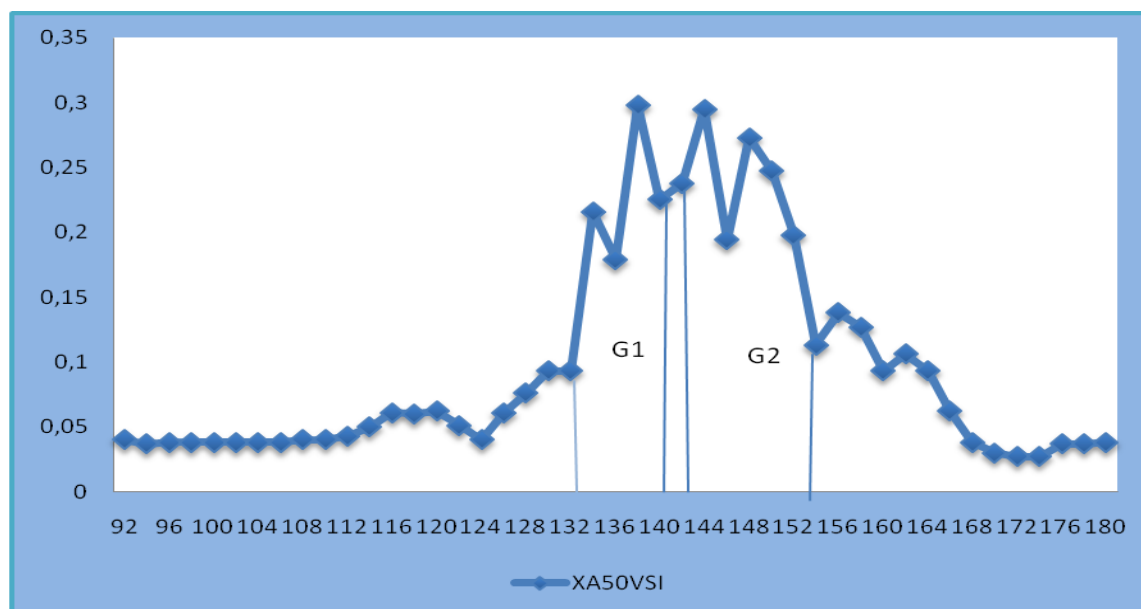


Figur 6.6: Relativ ICH₅₀-verdien for hver fraksjon i forhold til PMII. (ICH₅₀-verdien for hver fraksjon / PMIIs ICH₅₀-verdi)

Tabellen 6.3 og figurene (6.5 og 6.6) viser at XA50VSI, XA50VSII og XA50VSIII hadde lavere komplementfikserende aktivitet enn PMII. Aktiviteten til XA50VSII var høyere enn aktiviteten til XA50VSI og XA50VSIII. XA50VSIII hadde høyere aktivitet enn XA50VSI. Sammenlikner man aktiviteten til disse tre fraksjonene i forhold til de andre fraksjonene, viser de seg å ha høy aktivitet. ICH_{50} verdiene for de andre fraksjonene XA100VSI, XA100VSII og XAESI kunne ikke beregnes siden hemmingen ikke nådde 50 % for de konsentrasjonene brukt i testen. Dette tyder på at aktivitetene av disse fraksjonene er mye lavere enn aktiviteten av PMII.

6.4 Separasjon ved hjelp av gelfiltrering

På grunnlag av tidligere utført molekylvektbestemmelse ble det bestemt at en gelfiltreringskolonne av typen Sephacryl S-200 kan brukes for videre separasjon av fraksjonene fra ionebytterkromatografi. XA50VSI, XA50VSII, XA50VSIII ble applisert på gelfiltreringskolonne med Sephacryl S-200 HR-medium, ettersom disse fraksjonene viste god aktivitet i komplementfikseringstesten. Ved gelfiltrering ble forbindelsene separert videre etter molekylstørrelse, noe som medfører at fraksjonene ble rensert ytterligere. Etter elueringen med destillert vann, ble fenol-svovelsyretesten utført for å sette opp en karbohydratelueringsprofil. Vanneluatet ble deretter delt opp i fraksjoner på bakgrunn av karbohydratelueringsprofilen, som vist i figur 6.7. Utenom XA50VSII ble vanneluatet fra hver fraksjon delt opp i to fraksjoner. Fraksjonene ble kalt XA50VSI-G1, XA50VSI-G2, XA50VSIII-G1 og XA50VSIII-G2. Vanneluatet fra XA50VSII gav en fraksjon, den ble kalt for: XA50VSII-G1. Fraksjonene ble dampet inn og frysetørket, utbytte vises i tabell 6.4.



Figur 6.7: Karbohydrateuleringsprofilen av XA50VSI

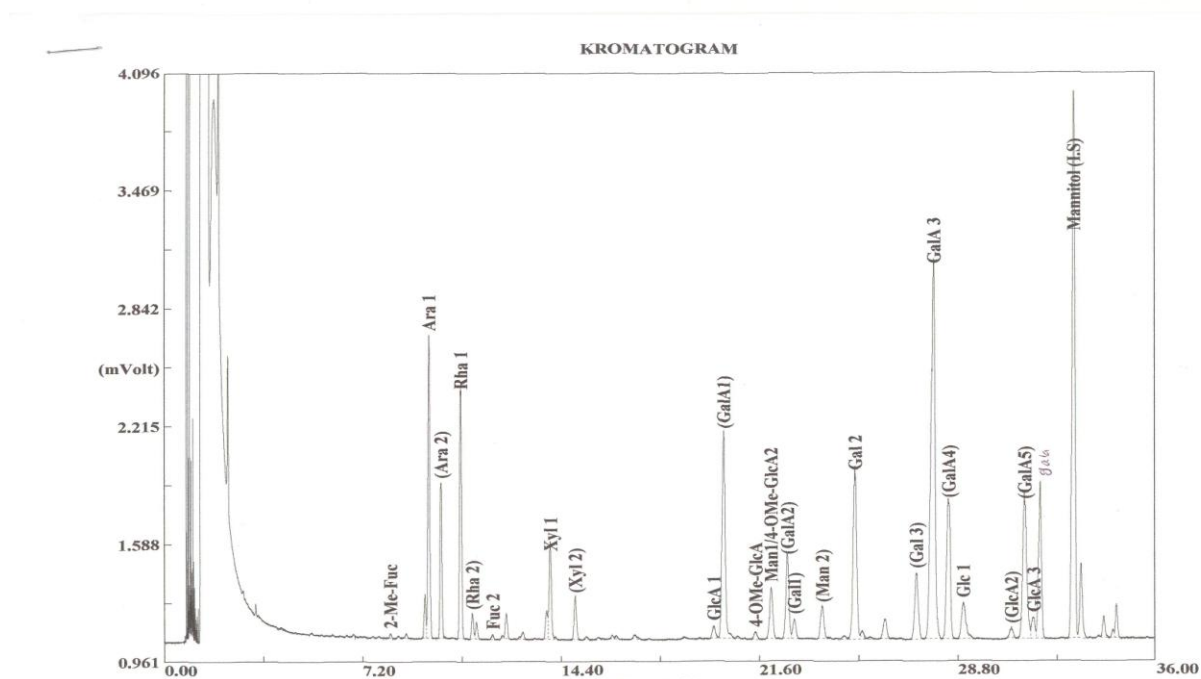
Fraksjonene	Utbytte (mg)	Utbytte (%)
XA50VSI-G1	9,60mg	9,58%
XA50VSI-G2	15,20mg	15,17%
XA50VSII-G1	28,3mg	39,20%
XA50VSIII-G1	17,3mg	23,50%
XA50VSIII_G2	38,3mg	52,04%

Tabell 6.4: Utbytte av fraksjoner etter gelfiltrering

6.5 Monosakkaridinnhold

Alle fraksjoner fra gelfiltrering ble analysert for karbohydratsammensetning og totalt karbohydratinnhold ved hjelp av metanolyse etterfulgt av TMS-derivatisering og GC-analyse.

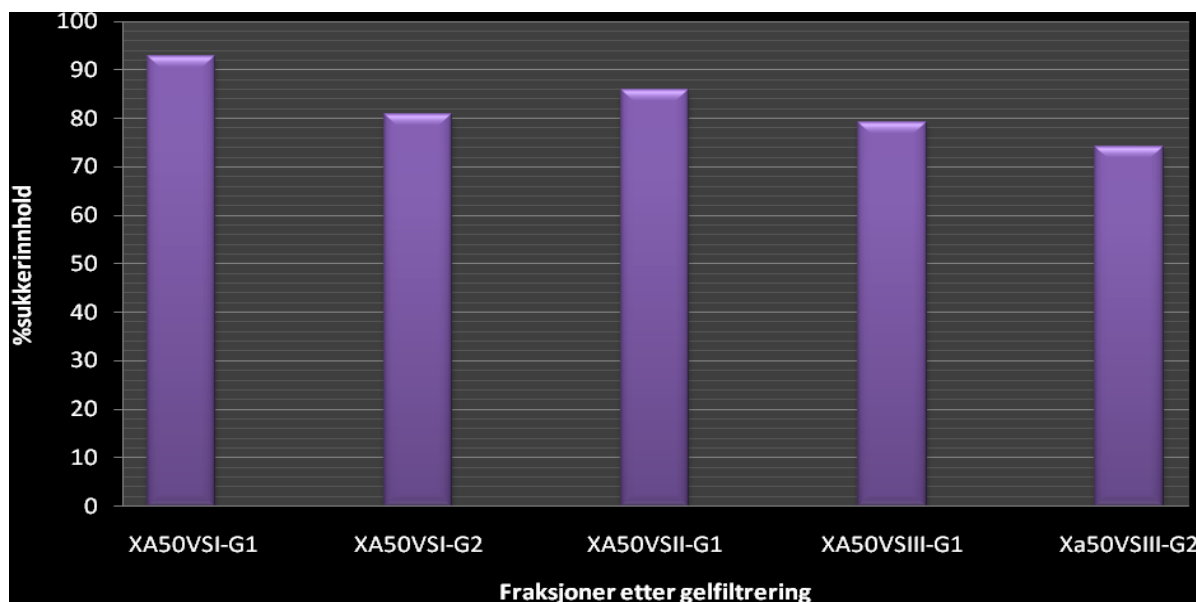
Etter metanolyse var polysakkaridene i de ulike prøvene spaltet i sine enkelte monosakkarider. Hvert monosakkarid vil da foreligge i flere forskjellige konformasjoner i løsnings på grunn av at en serie av reaksjoner tar plass. Disse ulike konformasjonene (åpen kjede, pyranose- eller furanoseform, α - og β - konfigurasjon) er antatt å være i likevekt med hverandre. I GC-kolonnen blir disse ulike konformasjonene retardert ulikt, og vil dermed et monosakkarid gi opphav til flere karakteristiske topper i kromatogrammet. Altså hvert monosakkarid gir et karakteristisk mønster av topper ved visse retensjonstider i GC-kromatogrammet. For hver fraksjon ble et gasskromatogram tatt opp. Figur 6.8 viser et eksempel på et gasskromatogram.



Figur 6.8 Gasskromatogramet av fraksjon XA50VSI-G1

Monosakkaridene i hvert gasskromatogram ble identifisert ved sammenligning med relative retensjonstider til standarder, som ble kjørt tidligere under de samme forhold og betingelser. Den relative retensjonstiden for hvert monosakkarid var beregnet i forhold til intern standarden, som ble tilsatt i kjent konsentrasjon og mengde. I identifiseringsprosessen ble også arealforholdet mellom toppene for hvert monosakkarid benyttet.

Da det er antatt at en likevekt er innstilte seg mellom de ulike konformasjonene, benyttes bare den største toppen for hvert monosakkarid i kromatogrammet til den kvantitative bestemmelsen. Der ble forholdet mellom det største topparealet til det enkelte monosakkaridet og topparealet til intern standarden benyttet.

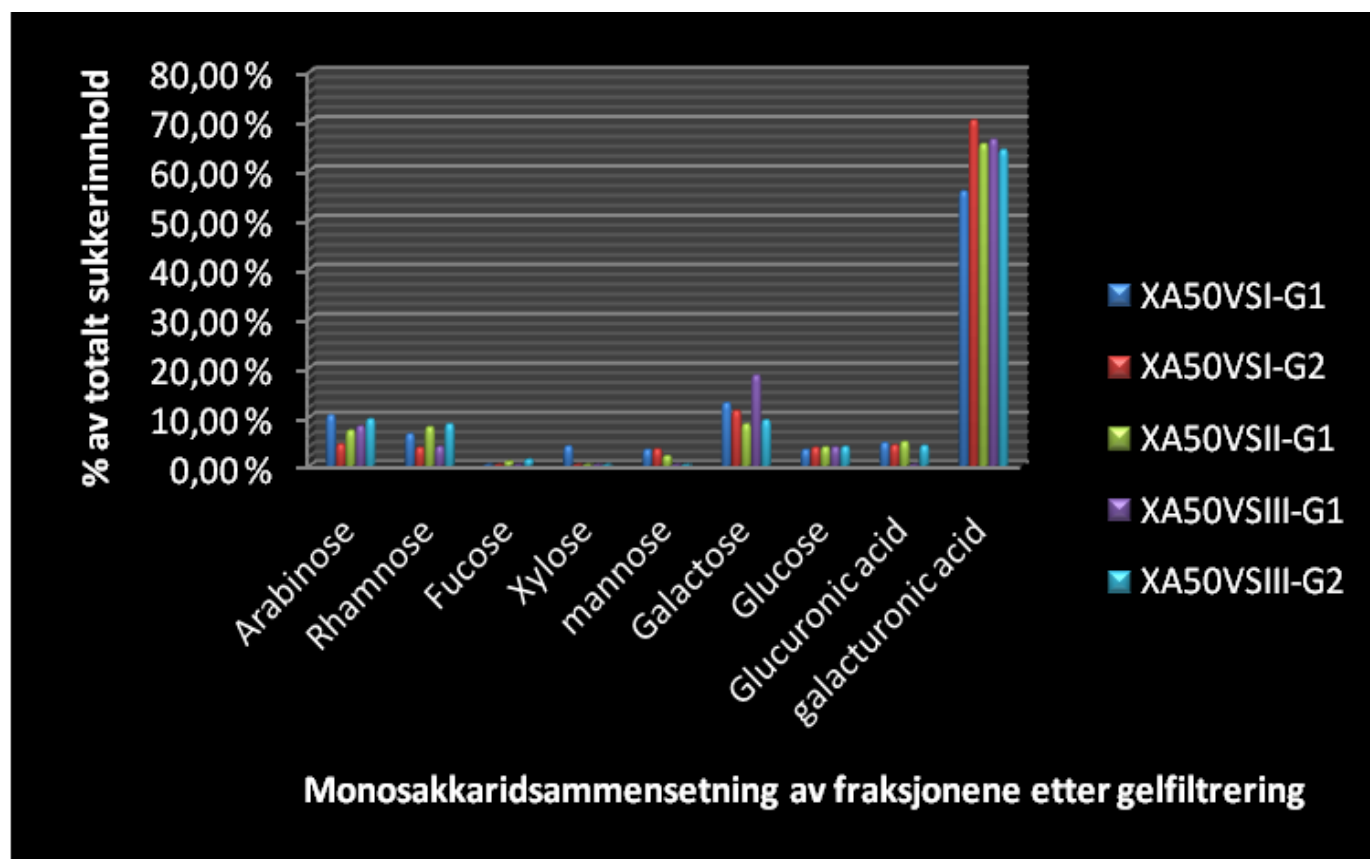


Figur 6.9: Totalt karbohydratinnhold i fraksjonene i forhold til total mengde prøve.

Figur 6.9 viser det totale karbohydratinnhold i hver fraksjon. For alle fraksjonene er karbohydratinnhold rimelig høy, særlig XA50VSI-G1(92,20 %). Dette er som forventet. Siden fraksjonene etter gelfiltrering ble ytterligere rensset fra andre uønskede stoffer, vil karbohydratsandelen bli høyere. Dette stemmer med at fraksjonene fra gelfiltrering hadde hvit farge.

	XA50VSI-G1	XA50VSI-G2	XA50VSII-G1	XA50VSIII-G1	XA50VSIII-G2
Arabi-nose	10,20 %	4,30 %	7,10 %	8 %	9,40 %
Rham-nose	6,40 %	3,60 %	7,80 %	3,80 %	8,40 %
Fucos-e	n.d	n.d	0,80 %	n.d	1,20 %
Xylos-e	3,90 %	n.d	n.d	n.d	n.d
Mann-ose	3,20 %	3,30 %	1,90 %	n.d	n.d
Galac-tose	12,70 %	11,10 %	8,40 %	18,30 %	9,20 %
Gluco-se	3,20 %	3,60 %	3,70 %	3,70 %	3,80 %
Glucuronic acid(1)	4,60 %	4,10 %	4,80 %	n.d	4 %
Galacuronic acid	55,70 %	70,10 %	65,30 %	66,20 %	64,10 %
% totale karbohydratinnhold%	92,90 %	80,90 %	86 %	79,30 %	74,20 %

Tabell 6.5. Monosakkaridsammensetning av fraksjonene etter gelfiltrering. Verdiene er gitt som prosent av totalt karbohydratinnhold i de ulike fraksjonene. n.d. = not detected



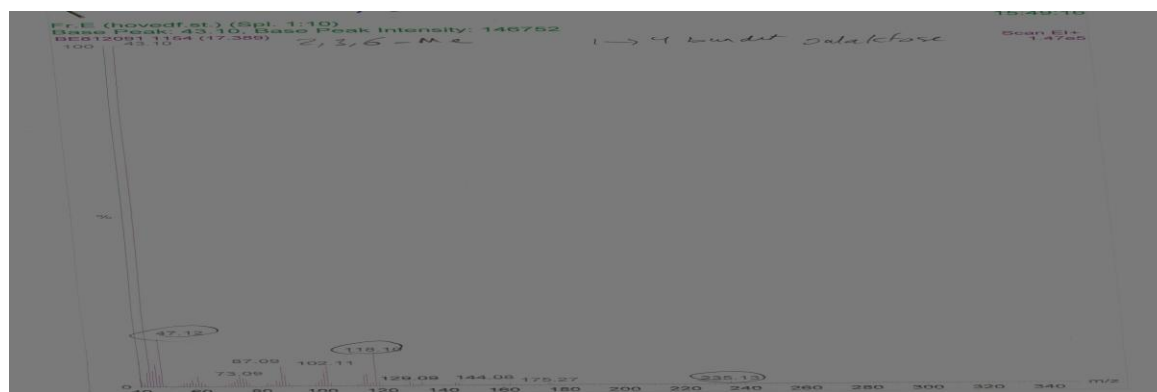
Tabell 6.10. Monosakkaridsammensetning av fraksjonene etter gelfiltrering. Verdiene er gitt som prosent av totalt karbohydratinnhold i de ulike fraksjonene.

Både tabell 6.5 og figur 6.10 viser monosakkaridsammensetningen av fraksjonene etter gelfiltreringen. Generelt kan man si at alle fraksjonene inneholder galakturonsyre, rhamnose, arabinose og galaktose. Dette er monosakkarider, som er typisk å finne i pektintype polysakkarid. Andelen av galaktose er relativt høy i alle fraksjonene, fra 8,40 % til 18,30 %. I tillegg til dette er det ganske høy andel av arabinose, noe som kan tyde på innhold av arabinogalaktaner. Forekomst av Rha i tillegg til GalA i alle disse fraksjonene kan også tyde på innhold av rhamnogalakturonaner. I pektin polysakkarider er glukose ikke så vanlig. I dette tilfellet

forekommer små mengder av glukose i hver fraksjon. Glukose kan komme fra ulike forurensningskilder, som fra ikke tilstrekkelig vasket glassutstyr. I fraksjonene hvor Glc, Xyl og Man forekommer i små mengder kan dette indikere på glukomananer og eller xyloglukaner, som er vanlige komponenter av plantet cellevegg. Xylose forekommer i XA50VSI-G1 hvor det er også høyt innhold av GalA, noe som kan også tyde på innhold xylogalakturenan. Fukose forekommer i veldig små mengder i to XA50VSII-G1 og XA50VSIII-G2. GlcA forekommer også i små mengder på alle fraksjonene unntatt XA50VSIII-G1, som viste seg egentlig å være aktiv ved komplementfikseringstest.

6.6 Bingsforhold

Alle fraksjonene etter gelfiltrering ble analysert med hensyn på bindingsforholdene mellom monosakkaridene ved hjelp av karboksylsyre-reduksjon etterfulgt av metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS-analyse, se figur 6.11



6.11: Massespektret av 1-4 bundet galakturonsyre.

Informasjonen om bindingsmønster mellom monosakkaridene er viktig for å kunne si noe om hvilke strukturer som er tilstede i et polysakkarid. Det vil si ved å bestemme hvilke bindinger som knytter monosakkaridene sammen kan man si noe om hvilke type polysakkarider som finnes i de ulike fraksjonene.

For hver fraksjon ble de ulike monosakkaridene og deres bindingstype identifisert ved hjelp av massespekter og retensjonstider, resultatet er vist i tabell 6.6. Da hver bindingstype for et gitt monosakkarid gir opphav til en topp i GC/MS-kromatogramet, kan mengden av et monosakkarid med en gitt bindingstype beregnes med hensyn på arealet under denne toppen. Verdiene ble så korrigert med resultatene av metanolysen. Det er tilknyttet en viss usikkerhet til beregningen av mengdeforholdene på den måten. Det skyldes at ikke alle toppene blir integrert optimalt, samt kan metanolysesresultatene være noe unøyaktige. Å angi den nøyaktige polysakkaridstrukturen blir dermed nesten umulig, men bare strekturens hovedtrekk kan foreslås.

Terminale glukose og glukuronsyre har lik retensjonstid ved GC-MS-analyse. Det vil si at de vises i samme topp, selv om de har ulike kjemiske strukturer. De kan likevel skilles fra hverandre ved at etter karboksylsyre-reduksjon med NaBD₄ vil glukuronsyrer ha fragmenter med masse +2 i forhold til glukose. Ut fra forholdet mellom intensiteten av fragmenteringstoppe 205 og 207 i massespekteret ble mengdeforhold mellom terminal glukose og terminal glukuronsyre bestemt. Det samme gjelder dersom man ønsker å skille mellom terminal galaktose og terminal galakturonsyre, mellom 1,4-bundet glukose og 1,4-bundet glukuronsyre og mellom 1,4-bundet galaktose og 1,4-bundet galakturonsyre.

Tabell 6.6 Fordelingen av de ulike monosakkaridene og deres bindingstyper til Fraksjonene etter gelfiltrering. Verdiene er beregnet som AUC, og angis i prosent av totalt karbohydratinnhold.

Arabinose	XA50VSI-G1	XA50VSI-G2	XA50VSII-G1	XA50VSIII-G1	XA50VSIII-G2
T _f	6,53	2,67	5,54	4,69	5,18
1→2,5	0,76	0,32	0,25	0,08	0,28
1→3	0,87	0,44	0,28	0,62	0,58
1→5	1,64	0,712	0,84	2,61	2,11
1→3,5	0,40	0,15	0,19	---	0,35
1→2	---	---	---	---	0,90
Sumen =	10,2	4,3	7,1	8	9,4

Rhamnose	XA50VSI-G1	XA50VSI-G2	XA50VSII-G1	XA50VSIII-G1	XA50VSIII-G2
T _p	3,01	1,31	4,04	1,81	----
1→2	3,39	1,81	3,21	1,99	----
1→2,4	---	0,48	---	---	spor
1→3	---	---	0,55	---	----
Sum =	6,4	3,6	7,8	3,8	8,4

Xylose	XA50VSI-G1	A50VSI-G2	XA50VSII-G1	XA50VSIII-G1	XA50VSIII-G2
1→4	----	spor	spor	spor	----

Fucose	XA50VSI-G1	XA50VSI-G2	XA50VSII-G1	XA50VSIII-G1	XA50VSIII-G2
T _f	----	----	----	----	1,2

Glukose	XA50VSI-G1	XA50VSI-G2	XA50VSII-G1	XA50VSIII-G1	XA50VSIII-G2
T _p	0,97	0,70	----	0,91	0,76
1→4	2,23	2,90	3,70	2,29	3,04
1→4,6	---	---	----	0,50	----
Sum=	3,2	3,6	3,7	3,7	3,8

Glukuronsyre	XA50VSI-G1	XA50VSI-G2	XA50VSII-G1	XA50VSIII-G1	XA50VSIII-G2
T _p	1,39	spor	----	spor	spor
1→4	3,21	3,30	----	spor	3,20
Sum=	4,6	4,6	0	0	4

Galaktose	XA50VSI-G1	XA50VSI-G2	XA50VSII-G1	XA50VSIII-G1	XA50VSIII-G2
T _p	3,81	3,56	3,89	4,49	4,51
1→3	0,66	0,78	0,78	0,48	---
1→3,6	5,07	2,96	2,21	2,09	2,69
1→6	3,16	3,80	1,52	0,93	1,2
1→4	----	-----	----	10,31	----
Sum=	12,7	11,1	8,4	18,3	9,2

Galakturonsyre	XA50VSI-G1	XA50VSI-G2	XA50VSII-G1	XA50VSIII-G1	XA50VSIII-G2
T _p	34,26	12,40	17,73	20,09	16,53
1→4	12,73	56,08	47,57	46,11	44,89
1→ 3,4	8,71	1,62	---	---	2,68
Sum=	55,7	70,1	65,3	66,2	64

Terminale monosakkarider (tabell 6.6)

Tabell 6.5 viser at alle fraksjonene inneholder terminale monosakkarider, men i varierende andel. Høyt innhold av terminale monosakkarider i en fraksjon tyder på at det er en stor grad av forgreningen i denne fraksjonen. Største andelen av terminale monosakkarider er i XA50VSI-G1 (49,97 %), noe som kan indikere på at pektiner i XA50VSI-G1 har høy grad av forgreningen.

Homogalakturonan (tabell 6.6)

Homogalakturonan har en hovedkjede bestående av 1,4-GalA. (Paulsen & Barsett 2005) Denne bindingstypen forekommer i høyt andel i alle fraksjonene, utenom XA50VSI-G1. Innholdet i XA50VSI-G1 er på 12,73 %, mens innholdet i de andre fraksjonene er fra 44,89 % til 56,08 %, som det vises i tabellen 6.5. Dette indikerer på at fraksjonene inneholder HGA, som er typisk struktur i pektintype polysakkarider.

Rhamnogalakturonan I (RG-I) (tabell 6.6)

Hovedkjeden av rhamnogalakturonan I består av alternerende α -1,2-rhamnose og α -1,4-D-galakturonsyreenheter. Rhamnoseenhetene er ofte forgrenet i C4-posisjon, forgreningen i C3-posisjon har også forekommet. (Paulsen & Barsett 2005) Utenom XA50VSIII-G2 inneholder alle de andre fraksjonene 1,2-Rha i tillegg til 1,4-GalA. Blant disse fraksjonene er det bare XA50VSI-G2 som inneholder 1,2,4-Rha med C-4 som forgreningspunkt. Forekomst av disse tre komponentene i XA50VSI-G2 viser tegn på at denne fraksjonen inneholder RG-I. Når det gjelder de tre andre fraksjonene kan de likevel inneholde RG-I, men at den er uforgrenet. Eller at RG-I i disse tre fraksjonene er lite forgrenet, og at forgreningspunkt dermed ikke er detektert. Det er også funnet spormengder av 1,2,4-Rha i XA50VSIII-G2, som ikke inneholder 1,2-Rha. I tillegg til 1,2,4-Rha inneholder denne fraksjonen mye av 1,4-GalA. Alt dette kan tyde på at RG-I kan finnes i veldig liten mengde i denne fraksjonen.

Rhamnogalakturonan II (RG-II) (tabell 6.6)

Hovedkjeden til RG-II består av 1,4 GalA med forgreningspunkter i C3-eller C4-posisjon, der oligosakkaridsidekjeder ofte er bundet. I disse sidekjedene forekommer en rekke sjeldne sukker, som 2-O-metylfucose, 2-O-metylfucose, apiose, aceric, 2-keto-3-deoxy-d-manno-

octulosonic acid(KDO) og 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid(DHA). (Paulsen & Barsett 2005) 1,4-GalA forekommer i alle fraksjonene, men 1,3,4-GalA med C-3 som forgreningspunkt er funnet i noen av disse fraksjonene. Da XA50VSI-G1, XA50VSI-G2 og XA50VSIII-G2 inneholder begge disse komponentene, kan dette indikere på at RG-II er tilstede. I XA50VSIII-G2 er også detektert 1,2-Fuc. Det kan antas at det er lite eller ikke noe RG-II tilstede i XA50VSII-G1 og XA50VSIII-G1, siden de ikke har 1,3,4-GalA.

Arabinogalaktan I (AG-I) (tabell 6.6)

AG-I har en hovedkjede av β -1,4- bundet galaktan med sidekjeder av α -1,5-bundet arabinan bundet via C3-posisjon i galaktoseenhetene (Paulsen & Barsett 2005). XA50VSIII-G1 er den eneste fraksjonen som inneholder 1,4-Gal. Dette kan indikere at det kun er denne fraksjonen som kan innhold AG-I. Forekomst av terminal- og 1,5-Ara i denne fraksjonen støtter funnet av AG-I. Siden AG-I eksisterer hovedsakelig som et strukturelement bundet til RG-I i pektinet, støtter funnet av AG-II at RG-I er tilstedet i XA50VSIII-G1.

Arabinogalaktan II (AG-II) (tabell 6.6)

AG-II er bygget opp av en hovedkjede bestående som oftest av 1,3- eller 1,6-bundet- β – D- galaktaner. Hovedkjeden med 1,3-galaktaner kan ha forgreining via C-6 med arabinofuranose og noe sjeldnere med arabinopyranose. (Paulsen & Barsett 2005) XA50VSIII-G2 er den eneste fraksjonen som inneholder bare 1,6-Gal ellers de andre fraksjonene inneholder både 1,6-Gal og 1,3-Gal. Dette kan tyde på at AG-II er tilstede i alle fraksjonene. Siden det ikke er funnet 1,3-Gal i XA50VSIII-G2, kan det tenkes at hovedkjeden til AG-II i denne fraksjonen bare består av 1,6-Gal. 1,3,6-Gal som finnes i sidekjedene til AG-II er også funnet i alle fraksjonene. XA50VSI-G1 har mer av 1,3,6-Gal i forhold til de andre fraksjonene, noe som kan tyde på at det er høy

forgreningsgrad i denne fraksjonen. Deteksjonen av terminal- og 1,3-Ara i alle fraksjonene støtter teorien om at fraksjonene inneholder AG-II.

Arabinaner (tabell 6.6)

Arabinaner er bygd opp av α -L-1,5-bundet Araf og de kan være lineære eller forgrenet ved C3-posisjon. Forgreningen ved C2-posisjon kan også forekomme. Sidekjedene består hovedsakelig av 1-3 arabinoseenheter. (Schols & Voragen 2002, Paulsen & Barsett 2005) Det er funnet 1,5-Ara i alle fraksjonene, noe som kan indikere på at arabinaner er tilstede. Alle fraksjonene utenom XA50VSIII-G1 inneholder 1,3,5-Ara med C-3 som forgreningspunkt. Det er også detektert 1,2,5-Ara i alle fraksjonene. Dette støtter funnet om at fraksjonene inneholder arabinaner. I XA50VSIII-G2 er det også funnet 1,2-Ara, noe som er uventet.

Andre strukturer

Stivelse eller forurensinger fra cellulose (tabell 6.6)

Terminal- og 1,4-Glc er funnet i alle fraksjonene og dette viser tegn på at fraksjonene kan inneholde stivelse og/ eller cellulose. I XA50VSIII-G1 er det også funnet 1,4,6-Glc.

Fukose, glukuronsyre

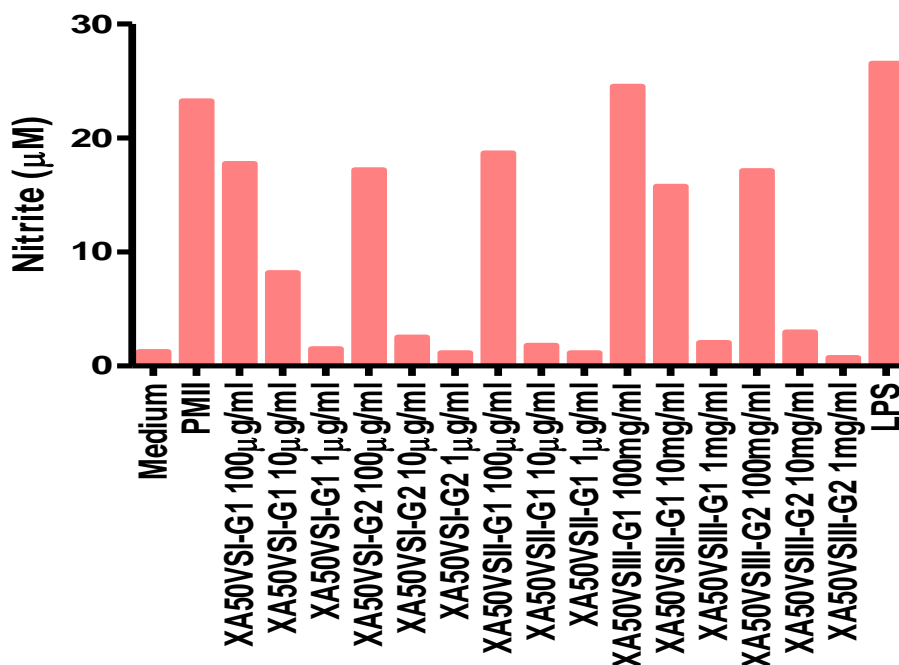
Både fukose og glukuronsyre kan forekomme som en del av sidekjedene som sitter på RG II, det avhenger av pektinkilde. (Schols & Voragen 2002)

6.7 Biologisk aktivitet etter gelfiltrering

6.7.1 Måling av NO-frigjøring fra makrofager

Denne testen ble utført på rikshospitalet av Kari Tvette Inngjerdingen

Når makrofager blir aktivert, stimuleres de til å utskille en rekke mediatorer. NO er en av disse mediatorene, som bidrar til immunresponsen. Frigjøring av NO fra makrofager kan måles ved å detektere nitritt, som er en av to stabile nedbrytingsprodukter fra NO. Ved hjelp av Griess-reagenssystem kan nitritt detekteres klorometrisk. Målingen av NO-frigjøring gir dermed en indikasjon på hvor effektiv en prøve er til å aktivere makrofagene. Denne testen ble utført på alle fraksjoner fra gelfiltrering og resultatet er vist i figur 6.12. I testen ble medium brukt som negativ kontroll, og LPS og PMII ble brukt som positive kontroller.

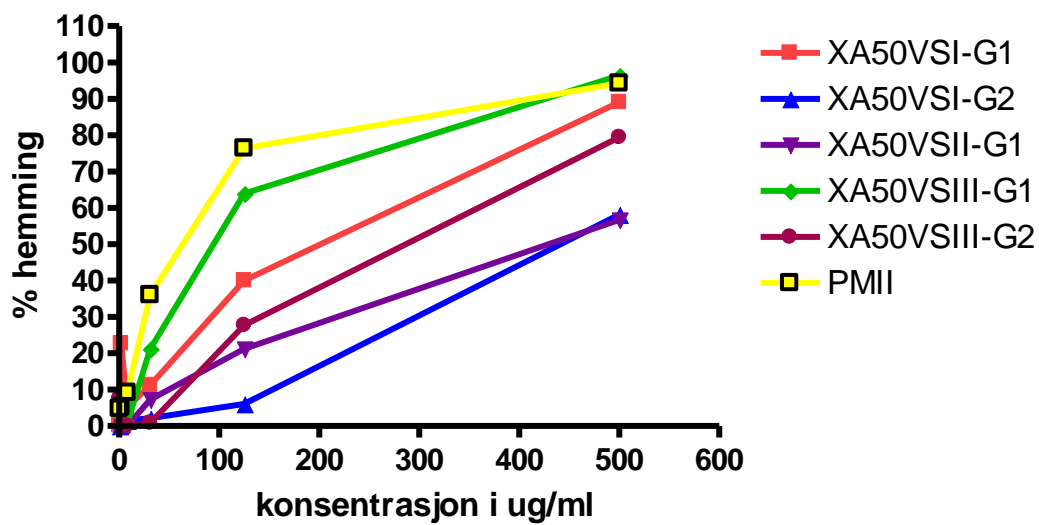


Figur 6.12: Måling av NO-frigjøring fra makrofager stimulert med vannekstrakter fra *Ximenia americana*

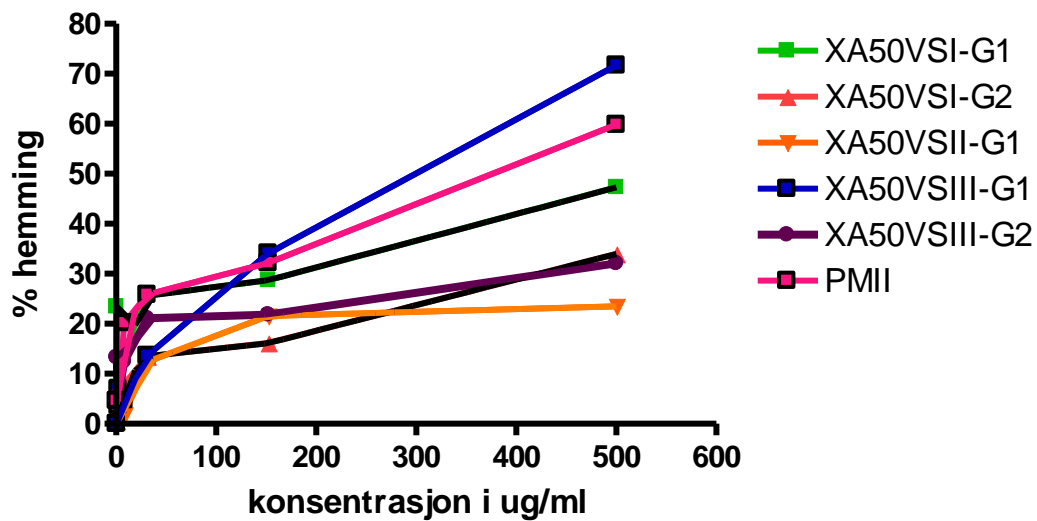
Figuren 6.15 viser at ved den laveste konsentrasjonen 1 µg/ml gir alle fraksjonene nesten like respons som den negative kontrollen. Ved den høyeste konsentrasjonen ser det ut at alle fraksjonene utøvere en aktivitet på makrofagene. Dette tyder på at det er en sammenheng mellom prøvekonsentrasjon og NO-frigjøring fra makrofagene. XA50VSIII-G1 synes riktignok å stimulere makrofagene i større grad enn resten av fraksjonene ved at den viser høy NO-frigjørende aktivitet ved konsentrasjonen 10 µg/ml. Ved den høyeste konsentrasjonen 100 µg/ml viser XA50VSIII-G1 seg til å kunne stimulere makrofagene like godt som PMII, men likevel mindre enn LPS. XA50VSI-G. XA50VSI-G1 viser også noe aktivitet ved konsentrasjonen 10 µg/ml. Både XA50VSI-G1 og XA50VSII-G1 ser ut til å ha høy NO-frigjørende aktivitet i konsentrasjonen 100 µg/ml. Aktiviteten til XA50VSI-G1 og XA50VSII-G1 er likevel lavere enn XA50VSIII-G1, LPS og PMII. Siden prøvematerialet av XA50VSI-G1 var veldig lite rundt 0,2 mg ble det bestemt å undersøke XA50VSIII-G1 og XA50VSII-G i de kommende tester.

6.7.2 Resultater fra komplementfikseringstest

Komplementfikseringstest ble utført på alle fraksjonene fra gelfiltrering for undersøke deres biologisk aktivitet, deretter bestemme på grunnlag av dette hvilke fraksjoner som skulle jobbes videre med. Testen ble utført to ganger.



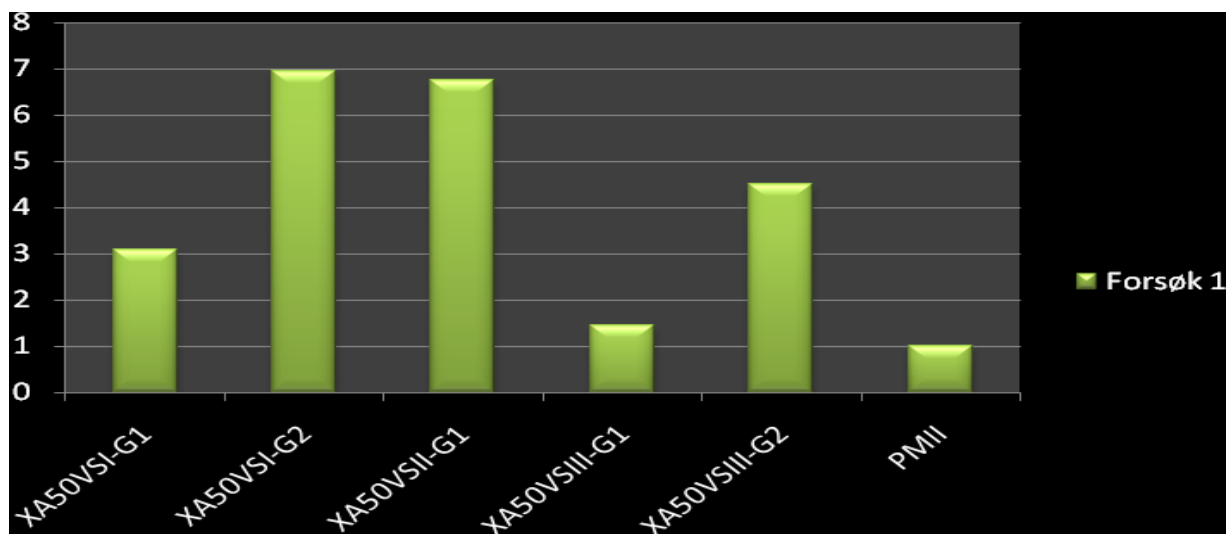
Figur 6.13. Komplementfikserende aktivitet av fraksjonene etter gelfiltrering ved forsøk1



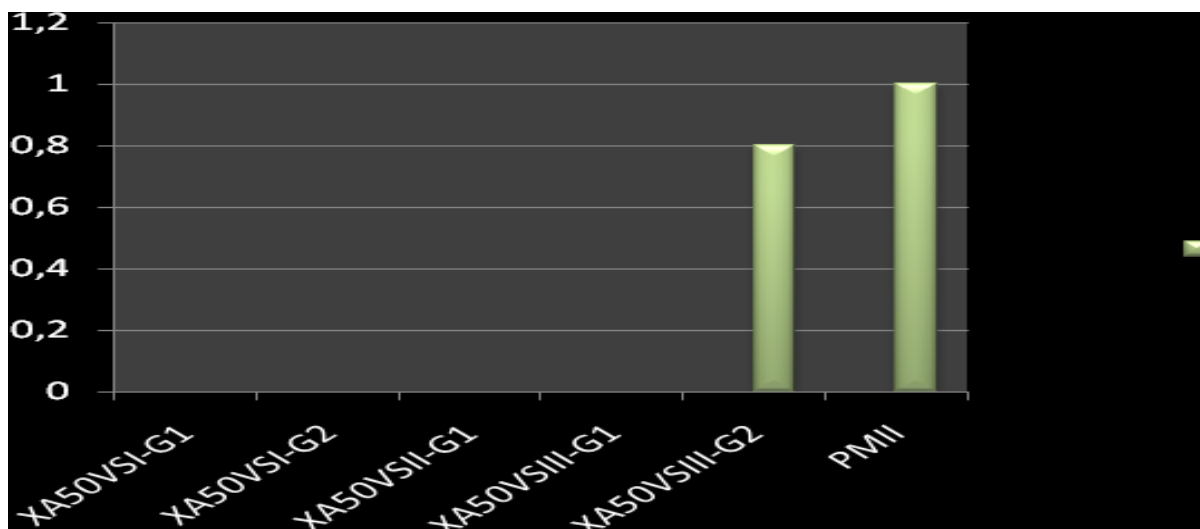
Figur6.14. Komplementfikserende aktivitet av fraksjonene etter gelfiltrering ved forsøk2

	ICH50 µg/ml	ICH50 µg/ml
Fraksjoner	Forsøk 1	Forsøk 2
XA50VSI-G1	201	
XA50VSI-G2	441,13	
XA50VSII-G1	429,21	
XA50VSIII-G1	94,34	
XA50VSIII-G2	286,66	299,35
PMII	63,5	376

Tabell 6.7 viser ICH_{50} -verdier til fraksjonene etter gelfiltrering ved begge forsøkene.



Figur 6.15: Relativ ICH_{50} -verdien for hver fraksjon i forhold til $PMII$ ved forsøk 1. (ICH_{50} -verdien for hver fraksjon / $PMII$ s ICH_{50} -verdi)



Figur 6.16: Relativ ICH_{50} -verdien for hver fraksjon i forhold til PMII ved forsøk 2. (ICH_{50} -verdien for hver fraksjon / PMIIs ICH_{50} -verdi)

Generelt viser alle figurene og tabellen at XA50VSIII hadde høyere enn og eller nesten lik komplementfikserende aktivitet som PMII. Aktiviteten til XA50VSIII var noe lavere enn PMII ved forsøk 1, men var likevel høyere i forhold til de andre fraksjonene. I forsøk 2 viste XA50VSIII-G1 høyere aktivitet enn PMII. De andre fraksjonene viste en langt svakere komplementfikserende aktivitet enn PMII ved forsøk 1 og ved forsøk 2 viste de ikke noe særlig aktivitet. Resultatene fra forsøk 2 var mer å stole på enn resultatene fra forsøk 1 fordi lyseringsgraden ved forsøk 2 var 60%, mens ved forsøk 1 var den på 32%. Det vil si at ved forsøk 1 var mindre sikker. Resultatene støtter funnet om at XA50VSIII-G1 er den eneste fraksjon som inneholder RG-I, det hårte regionen. Det er RG-I som ofte rapporteres å ha mer potent komplementfikserende aktivitet. (Yamada & Kiyohara 1999)

6.8 Strukturoppklaring etter enzymatisk degradering

6.8.1 Enzymdegradering

Det ble besluttet å arbeide videre med fraksjonene XA50VSII-G1 og XA50VSIII-G1 på grunnlag av resultatene fra komplementfikseringstest og måling av NO-frigjøring fra makrofager. Resultatene fra metanolysen og metylering tyder på at disse to fraksjonene kan inneholde pektintype polysakkarider. Siden pektiner er store molekyler må man degradere dem enzymatisk for å få mer informasjon om struktur og aktivitetsforhold. I begge fraksjonene andelen av arabinose ganske høy, derfor ble det bestemt å benytte enzymet arabinofuranosidase for å få brutt ned noe av strukturen i de `` hårete områder `` av pektinet. Etter enzymatisk degradering ble løsningen av hver prøve applisert på PD10-kolonne for å få separert de store pektinområdene fra de mindre avspaltede Ara-forbindelsene. Hver prøve ble deretter eluert ut i en fraksjon med destillert vann. Fraksjonene ble kalt for XA50VSII-G1z og XA50VSIII-G1z og utbyttet vises i tabell 6.8. Fraksjonene ble frysetørket og tatt videre til metanalyse og komplementfikseringstest.

Fraksjonene	Utbytte (mg)	Utbytte (%)
XA50VSII-G1z	1mg	20
XA50VSIII-G1z	0,4mg	8

Tabell 6.8: Utbytte etter enzymatisk degradering

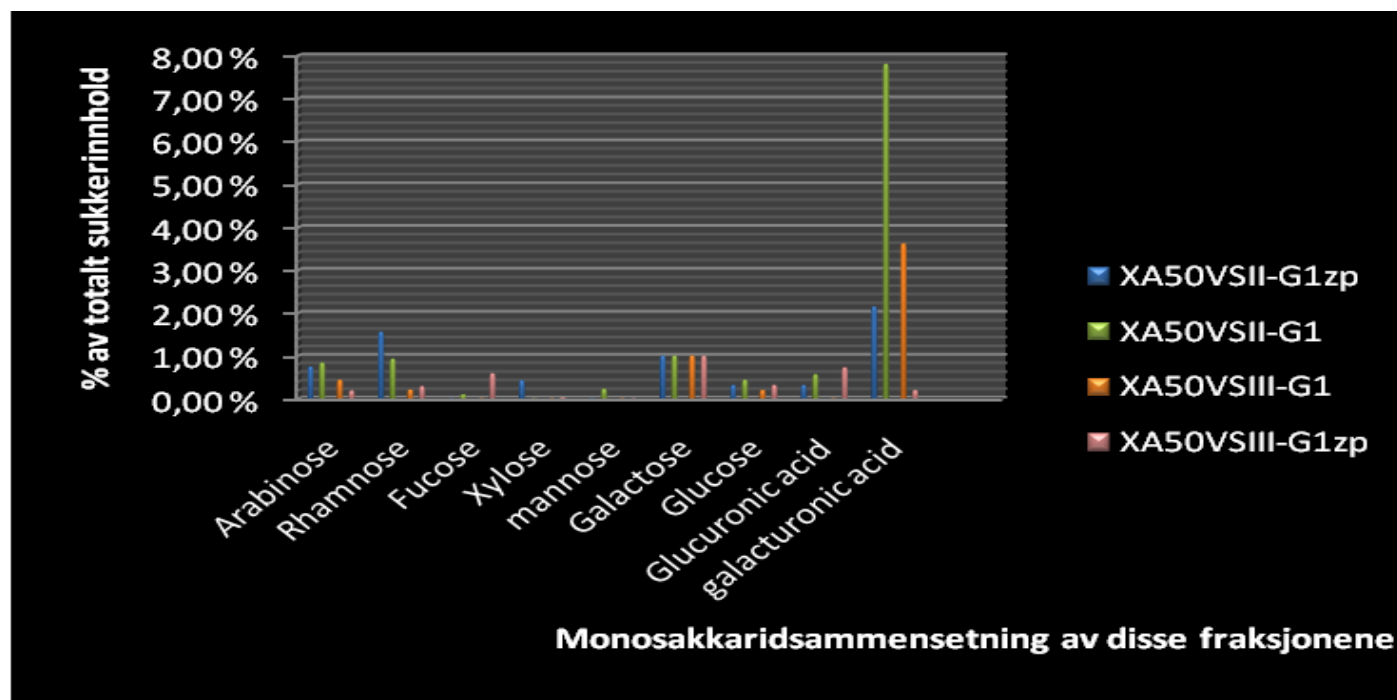
6.8.2 Monosakkaridsammensetning

Monosakkaridsammensetningen av XA50VSII-G1zp og XA50VSIII-G1zp ble bestemt etter metanolyse, TMS-derivatisering og GC-analyse.

Andelen av galakturonsyre var sterkt redusert i begge fraksjonene. Teorien bak dette er at galakturonsyre var hydrolysert. Generelt har polyuronider ansett for å være mer stabile til sure hydrolyse enn nøytrale polysakkarider, men bare ved $\text{pH} < 1$. Ved pH høyere enn 1 blir polyuronider hydrolysert. (Smidsrød, et al 1966). Dette vil si at uronsyrer blir hydrolysert ved pH høyere enn 1. Dette støtter teorien om at galakturonsyre var hydrolysert under denne enzymdegraderingsprosessen, der det ble benyttet $\text{pH} = 4$. Det er derfor var detektert andelen av galakturonsyre etter enzymdegradering liten i begge fraksjonene. Andelen av glukuronsyre var også redusert i XA50VSII-G1zp i forhold til XA50VSII-G1. For hver fraksjon ble derfor mengden av hvert monosakkarid etter metanolysen justert i forhold til mengden av galaktose, siden den ikke var mye endret. For å kunne sammenligne med verdiene før enzymdegradering ble mengden av hvert monosakkarid i XA50VSII-G1 og XA50VSIII-G1 etter metanolysen også justert i forhold til mengden av galaktose. Tabell 6.9 og figur 6.17 viser monosakkaridsammensetning etter justeringen.

	XA50VSII-G1	XA50VSI-G1zp	XA50VSIII-G1	XA50VSIII-G1zp	
Arabi-nose	0,84%	0,75%	0,44%	0,19%	
Rham-nose	0,93%	1,56%	0,21%	0,29%	
Fucos-e	0,1%	n.d	n.d	0,59%	
Xylos-e	n.d	0,43%	n.d	0,03%	
Mann-ose	0,23%	n.d	n.d	n.d	
Galac-tose	1%	1%	1%	1%	
Gluco-se	0,44%	0,32%	0,20%	0,32%	
Glucuronic acid(1)	0,57%	0,322%	n.d	0,73%	
Galacuronic acid	7,80%	2,15%	3,62%	0,20%	

Figur 6.9: Monosakkaridsammensetning etter enzymdegradering. XA50VSII-G1zp og XA50VSIII-G1zp sammenlignet med XA50VSII-G1 og XA50VSIII-G1. Verdiene er oppgitt som prosent av totalt karbohydratinnhold. N.d = not detected



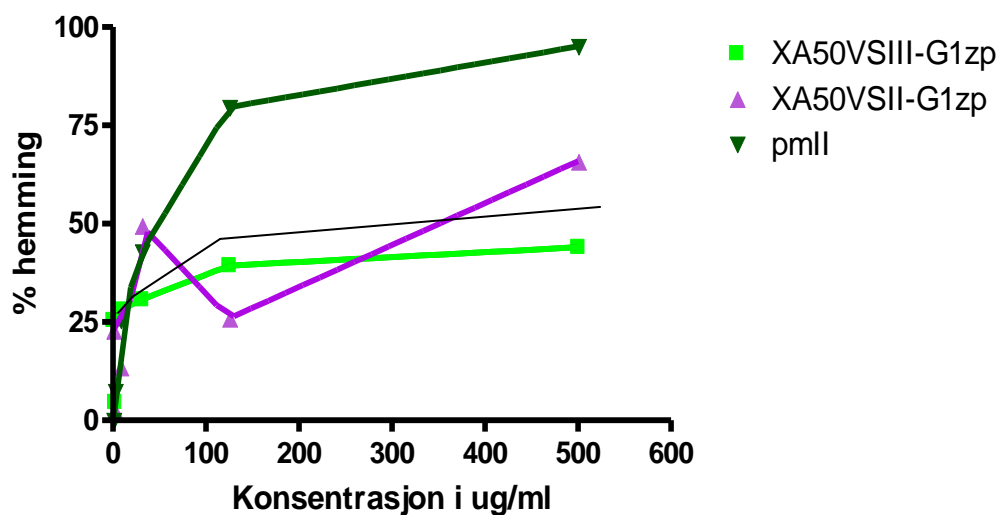
Figur 6.17: Monosakkaridsammensetning etter enzymdegradering. XA50VSII-G1zp og XA50VSIII-G1zp sammenlignet med XA50VSII-G1 og XA50VSIII-G1. Verdiene er oppgitt som prosent av totalt karbohydratinnhold.

Da det ble benyttet arabinofuranosidase forventes det at arabinose på furanoseform ble spaltet av og dermed vil totale mengden av arabionse i en prøve bli redusert. Tabell 6.9 og figur 6.20 viser at mengden av arabionse er redusert til halv parten i XA50VSIII-G1zp, mens i XA50VSII-G1zp er blitt mindre. Dette tyder på at enzymet har fungert, men kanskje ikke 100 %. Siden prosentandelen av arabiose ble redusert, ble prosent andelen til et annet av de detekterte monosakkaridene økt for at summen kunne bli 100 %. Det samme gjelder prosentandelen av galakturonsyre, som var hydrolysert. Dette er derfor verdiene i noen monosakkarider av XA50VSII-G1zp og XA50VSIII-G1zp var høy i forhold til XA50VSII-G1 og XA50VSIII-G1.

6.8.3 Biologisk aktivitet etter enzymdegradering

6.8.3.1 Komplementfikseringstest

Komplementfikseringstesten ble utført på de to enzymdegraderte fraksjonene XA50VSII-G1zp og XA50VSIII-G1zp. Ved å sammenligne aktiviteten i disse med aktiviteten funnet hos de samme fraksjonene før enzymdegradering, kan man få informasjon om aktiviteten til de hårete områdene. Da det ble benyttet arabinosefuranosidase kan man i tillegg vurdere hvordan arabinose påvirker polysakkaridets komplementfikserende aktivitet. Figur 6.18 viser komplementfikserende aktivitet, sammenlignet med standarden PMII. Siden XA50VSIII-G1zp ikke nådde 50 % hemming av hemolyse kunne ikke ICH_{50} -verdien ble beregnet. XA50VSII-G1zp har fått veldig høy ICH_{50} -verdi. Generelt har begge fraksjonene etter enzymdegradering fått dårligere komplementfiksende aktivitet enn før. Siden fraksjonene skulle etter enzymdegradering innholde en større andel hårete områder, forventes det at fraksjonene viser mer potent komplementfiksende aktivitet enn før enzymdegradering. (Yamada & Kiyohara 1999) Teorien bak dette er at mengden av galakturonsyre var redusert under enzymdegradering og derfor har fraksjonene fått dårligere aktivitet. På en annen side kan tilstedeværelse av arabinose viktig for polysakkaridenes aktivitet. For XA50VSII-G1zp går kurven opp og ned, noe som tyder på feil pipetteringsfeil. Den forventet kurven er tegnet i svart farge for denne fraksjonen.



Figur6.18: Komplementfikserende aktivitet etter enzymdegradering

7. Mulighet for videre studier

Generelt tyder resultatene fra denne oppgaven på at vannekstrakter inneholder biologiske aktive polysakkarider, muligens pektiner. På grunn av tidsbegrensning forble en del av arbeidet på disse pektinpolysakkarider ugjort. Følgende punkter vil derfor være aktuelt for videre studier:

- Fraksjonen XA50VSI-G1 kan bli enzymdegradert, siden den viste høy stimulering på makrofagene.
- Resultatene fra komplementfikseringstesten for fraksjonene som var enzymdegradert bør bekreftes med flere forsøk.

- Siden galakturonsyre ble hydrolysert under enzymdegradering bør denne utføres igjen med passende forhold. Det kan også bli benyttet et annet enzym for å få fjernet andre strukturelle elementer av pektinspolysakkarider.

8. Konklusjon

Isolering

Råektraktene som ble oppnådd etter at plantematerialet ble ekstrahert med 50 % etanol, 50 °C, og 100 °C vann, ble rensert og fraksjonert med ionebytterkromatografi. Etter ionebytterkromatografien forelå det totalt 3 nøytrale og 5 sure fraksjoner. XA50VSI, XA50VSII og XA50VSIII ble fraksjonert videre med gelfiltreringskolonnen og disse gav totalt opphav til 5 nye fraksjoner. XA50VSI-G1, XA50VSI-G2, XA50VSII-G2, XA50VSIII-G1 og XA50VSIII-G2. XA50VSII-G1 og XA50VSIII-G1 ble enzymdegradert og deretter applisert gjennom PD-10 kolonnen. Etter enzymdegradering ble de to nye fraksjonene kalt for XA50VSII-G1zp og XA50VSIII-G1zp.

Struktur og biologisk aktivitet

Blant de sure fraksjonene etter ionebytterkromatografi viste XA50VSI, XA50VSII og XA50VSIII lavere komplementfikserende aktivitet enn PMII. De ble vurdert å ha aktivitet i forhold til de andre fraksjonene. De disse ble også undersøkt med hensyn på molekylvektsdistribusjon. De var polydisperse blandinger og molekylvektene spredt seg fra 8405,2 Da til over 2000000 Da.

XA50VSIII-G1 hadde høyeste NO- frigjørende aktivitet blant fraksjonene fra gelfiltrering, noe som er i tråd med sin komplementfikserende aktivitet. XA50VSIII-G1 viste også høyeste komplementfikserende aktivitet blant alle fraksjonene. Aktiviteten til denne fraksjonen var høyere enn PMII. XA50VSI-G1 hadde også evne til å stimulere makrofager. Videre viste XA50VSI-G1 også noe komplementfikserende aktivitet, som lavere enn PMII. XA50VSII-G1 så

ut til å kunne på virke makrofagene. På bakgrunn av dette ble XA50VSIII-G1 og XA50VSII-G1 enzymdegradert. XA50VSI-G1 skulle også bli enzymdegradert, men det var ikke nok prøvematerialet. Basert på resultatene fra metanolysen hadde disse fraksjonene høy karbohydratinnhold. Karbohydratinnholdet var på 79 % eller høyere. Innholdet av arabinose, Rhamnose, galaktose og galakturonsyre i disse fraksjonene er noe som indikerer på innhold av pektintype polysakkarider. XA50VSIII-G1 innholdte også glukose, men bare i liten mengde. Xylose, fukose og glukose er også tilstedet i XA50VSI-G1 og XA50VSII-G1 i varierende mengde. Dette kan tyde på at tilstedeværelse av xylose, fukose, mannose og glukose har ikke mye å si for aktiviteten.

Fra resultatene av metyleringen ser ut som om XA50VSIII-G1 inneholder homogalakturenan, rhamnosegalakturonan I, arabinogalaktan I, arabinogalaktan II. forekomst av rhamnosegalaktan II kan være muligens. Dette tyder på innhold av pektinpolysakkarid i denne fraksjonen. Blant alle fraksjonene fra gelfiltrering ser det ut til at bare XA50VSIII-G1 som inneholder AG-1, noe som støtter forekomst av RG-I i denne fraksjonen. Dette er noe i tråd med at den viste høyeste antikomplementære effekten. XA50VSI-G1 og XA50VSII-G1 ser også ut til å kunne inneholde pektintype polysakkarider. Begge kan ha inneholde av homogalakturenan, arabinaner, arabinogalaktan II og muligens forekomst av RG1. XA50VSI-G1 ser ut til å inneholde RGII, noe som forklarer sin evne til å stimulere makrofagene mer enn XA50VSII-G1.

Resultatene fra komplementfikseringstesten til fraksjonene som ble enzymdegradert viste nedgang på antikomplementære effekten. Antikomplementære effekten ble vanskelig å vurdere ut fra disse resultatene siden testen ble utført bare 1 gang. I tillegg til at den reduserte mengden av galakturonsyre hadde sterk påvirkning på resultatene. En mulighet at effekten ble mindre, fordi arabinose ble fjernet.

Det ble rapportert at vann ekstraktet av *Ximenia americana* har en komplementfikserende aktivitet og det inneholdt arabinose, rhamnose og galaktose. (Diallo et al 2002) Dette støtter resultatene fra oppgaven som tyder på at vannekstrakter fra *Ximenia americana* inneholder biologiske aktive polysakkarider.

9.Reagensliste

1 –metylimidazol	Fluka
α - arabinofuranosidase B, Ara-B-4002	(Megazyme)
Ammoniakk- løsning (NH ₃)	Prolabo
Carbodiimide	Aldrich
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck
Diklormetan (DCM)	Fluka
Etanol	Merck
Eddiksyreanhydrid	Merck
Erytrocytter fra sau: Hvit 161, tappet 6.08.2009	FHI
Edikksyre	Merck
Fenol	Merck
Heksametyldisilazan(HMDS)	Aldrich
Komplementkilde: ECG, 14.02.2008	FHI
Kloroform	Merck
Mes (2- [N-Morpholino] etan svovelsyr)	Sigma [®]
Mannitol	Sigma [®]
Metanol , vannfri	Sigma [®]
Metyljodid (CH ₃ I)	Fluka
Natriumhydroksid (NaOH)	Prolabo

Natriumthiosulfat	Merck
Natriumbordeuterid (NaBD_4)	Isotec TM
Natriumazid (NaN_3)	Merck
Natriumklorid	Prolabo
Natriumacetat	Prolabo
Oktanol	Merck
Pyridin	Merck
Saltsyre	Merck
Sølvnitrat (AgNO_3)	Merck
Svovelsyre (H_2SO_4)	Merck
Toluen	Prolabo
Trimetylklorsilan (TMCS)	Fluka
TRIZMA (tris [hydroksymetyl] aminometan)	Sigma [®]
Trikloreddiksyre (TFA)	Merck

10. Referansliste

- Aspinall, G.O. (1973): Carbohydrate polymers of plant cell walls. In Loewus, F.A. (red.): Biogenesis of cell wall polysaccharides, Academic Press, S. 99.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002): CELL JUNCTIONS; CELL ADHESION, AND THE EXTRACELLULAR MATRIX. In MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, 4, Garland Science, a member of the Taylor&Fracis Group, S. 1118-11124.
- Asres, K., Bucar, F., Kartnig, T., Witvrouw, M., Pannecouque, C. and De Clercq, E. (2001): Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected Ethiopian medicinal plants, Phytotherapy Research, 15, 62-69.
- Ababacar, M., Diallo, D., Fane, S., Sanogo, R., Paulsen, B. S. and Cisse, B. (2005): A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literature search of modern pharmacology and toxicology, Journal of Ethnopharmacology, 96, Elsevier Ireland LTD, 183-193.
- BUCHI Labortechnik AG (2010): BUCHI Laboratory Equipment. <http://www.buchi.com/Home.1.0.html>, aksesert 05.10.2009.
- Bochkov, A. F., Zaikov, G. E. and Afanasi, V. A. (1991): Carbohydrates, VSP BV, the Netherlands, S. 64-66.
- Booth, F. E. M. and Wickens, G. E. (1988): Non-timber uses of selected arid zone trees and shrubs in Africa, bind 19, Food & Agriculture Org, S. 157.
- Brummer, Y. and Cui, S.W. (2006): Detection and determination of Polysaccharides in Foods. In Stephen, A. M., Phillips, G. O. and Williams, P. A. (red.): Food Polysaccharides and Their Applications, 2, Taylor & Francis Group, S. 689-690.
- Bristol University (2002-2010): Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/gcms.html, aksesert 21.03.2010.
- Beldman, G., Schols, H. A., Pitson, S. M., Searle-van Leeuwen, M. J. F. and Voragen, A.G.J. (1997): ARABINANS AND DEGRADING ENZYMES. In Sturgeon, R. (red.): Advances in Macromolecular Carbohydrate Research, bind 1, Elsevier, S. 3-11.
- Chamber, R. E. and Clamp, J. R. (1971): An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials, Biochem J, 125, 4, 1009-18.

- Corley, R. B. (2005): DETECTION AND ANALYSIS OF Proteins. In A guide to methods in the biomedical sciences, Springer, S. 16.
- Cui, S. W. (2005): structural Analysis of polysaccharides. In Cui, S. W. (red.): Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications, CRC Press, Taylor & Francis Group, S. 108-115.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28, S. 350-6.
- Dodds, A. W. and Sim, R. B. (1997): The complement system. In complement a practical, bind 182, Oxford university press, S. 1-11.
- Dunkelberger, J. R. and Song, W. (2010): Complement and its rol in innate and adaptive immune responses, Cell Research, Review, 20, 34-50.
- Diallo, D., Sogn, C., Samake, F. B., Paulsen, B. S., Michaelsen, T. E. and Keita, A. (2002): Wound Healing Plants in Mali, the Bamako region. An Ethnobotanical survey and Complement Fixation of water Extracts from Selected Plants, Pharmaceutical Biology, 40, 117-128.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956): Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry, 28, 3, 350-356.
- Evert, R. F., ESAU, K. (2006): CELL WALL. I Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development, 3, John Wiley and Sons, 3, S.66-67.
- Field, J. A. and Lettinga, G. (1992): Biodegradation of Tannin. In Sigel, H. and Sigel, A. (red.) metalions in biological systems: degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes, bind 28, CRC Press, S. 60-61.
- Greibrokk, T. (2005 a): Ionebytterkromatografi. In Greibrokk,T., Lundances, E. and Rasmussen, K. (red.): Kromatografi: Separasjon og deteksjon. [Oslo], Universitetsforlaget. S. 60-79.
- Greibrokk,T.(2005 b): Eksklusjonskromatografi (gelkromatografi). In Greibrokk,T., Lundances, E. and Rasmussen, K. (red.): Kromatografi: Separasjon og deteksjon. [Oslo], Universitetsforlaget. S. 80-100.

- GE Healthcare Bio-Sciences AB (2006): Gel filtration, Principles and Methods. http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/content/LD_153206006-R350, aksessert 21.01.2010.
- GE Health (2004): Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing, Principles and Methods. http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/LD_273053445-R350, aksessert 21.01.2010.
- GE Healthcare Bio-science AB (2007): PD-10 Desalting Columns, In Instructions 52-1308-00 BB, S. 1-10.
- GE Healthcare Bio-sciences AB (2008): Sephacryl High Resolution media, HiPrep Sephacryl High Resolution columns. In Gel filtration. 18-1060-88 AD.
- Gullon, P., Gullon, B., Moure, A., Alonso, J., Dominguez, H. and Parajo, J. (2009): Manufacture of Prebiotics from Biomass Sources. In Dimitris, C. and Robert, R. (red.): Prebiotec and Probiotics Science and Technology, Springer Science Business Media, S. 560 - 564.
- Grønhaug, T. E., Glæserud, S., Skogsrud, M., Ballo, N., Bah, S., Diallo, D. and Paulsen, B.S. (2008): Ethnopharmacological survey of six medicinal plants from Mali, West Africa, Journal of Ethnobiology and Ethnomedicin, 4.
- Houghton, P. J. and Raman, A. (1998): Laboratory handbook for fractionation of natural extracts, Springer, S. 64-66.
- Izydorczyk, M. (2005): Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates. In Cui, S.W. (red.): Food carbohydrates: Chemistry, physical properties and Applications, CRC Press, Taylor & Francis Group, S. 55- 60.
- Izydorczyk, M. (2005): Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates. In Cui, S., W. (red.): Food carbohydrates: Chemistry, physical properties and Applications, CRC Press, Taylor & Francis Group, S. 1-66.
- Inngjerdingen, K., Nergard, C. S., Diallo, D., Mounkoro, P.P. and Paulsen, B. S. (2007): Polysaccharides with complement fixing and macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, isolation and partial characteriastion. Journal of Ethnopharmacology, 92, 233-244.
- Jacob, N. (2009): Pectinolytic Enzymes. In Nigam, P. S., Pandey, A. (red.): Biotechnology for Agro-Industrial residues Utilisation: Utilisation of Agro-residues, springer, S. 384-387.
- James, D. B., Owolabi, A. O., Ibbiyeye, H., Magaji, J., and Ikugiyi, Y. A. (2008): Assessment of the hepatic effects, heamatological effect and some phytochemical constituents of *Ximenia Americana* (leaves stem and root) extracts, African Journal of biotechnology, 7, 4274-4278.

- James, D. B., Abu, E. A., Wurochekke, A. U. and Orji, G.N.(2007): Phytochemical and Antimicrobial Investigation of the Aqueous and Methanolic Extracts of *Ximenia Americana*, ANSI net, 7, 284-288.
- Kim, J. B. and Carpita, N. C. (1992): Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles. *Plant Physiol*, 98, 2, 646 - 653.
- Koné, W. M., Atindehou, K. K., Terreaux, C., Hostettman, K., Traore, D. and Dosso, M.(2004): traditional medicine in North Côte-d Ivoire: Screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity, journal of Ethnopharmacology, Elsevier Ireland Ltd, 93,43-49.
- Lacaille-Dubois, M. A., and Wagner, H. (2000): BIOACTIVE SAPONINS FROM PLANTS: AN UPDATE. In Rahman, A., U., (red.) studies in natural Products Chemistry, 21, Elsevier Science B. v., S. 63-634.
- labataqa , V.(2009): www.zazzle.de/fplc_karte-137515903701631932, aksessert 25.2.2010
- Metafro (2010): *Ximenia Americana* L. In Prelude Medicinal Plants database.
- http://www.metafro.be/prelude/view_plant?pi=13140, aksessert 12.04.2010.
- Michaelsen, T. E., Gilje, A., Samuelsen, A.B., Hogasen, K. and Paulsen, B.S. (2000): Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. Scandinaian Journal of Immunology, 52, 5, 483-490.
- Mogan, B. P. (2000): The complement system. In Complement methods and protocols, bind 150, Humana Press, s. 1-6.
- Maiga, A., Diallo, D., Fane, S., Sango, R., Paulsen, B.S. and Cisse, B. (2005): A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literature search of modern pharmacology and toxicology, Journal of Ethnopharmacology, 96, Elsevier Ireland Ltd, 183-193.
- Madigan, M.T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2003): Brock Biology of Microorganisms. Pearson Educatio, USA, S. 756-777.
- Mahmoudi, M., Mollnes, T. E., Kuijpers, T. W. and Roos, D. (2008): Complement Deficiencies. In Rezaei, N., Notarangelo, L. D. and Aghamohammadi, A. (red.): Primary Immunodeficiency Diseases: Definition, Diagnosis, and Management, Springer, S.235-236.
- Omer, M., Elnima, E. I. (2003): Antimicrobial activity of *Ximenia americana*, Fitoterapia, 74, Elsevier science B.v, S. 122-126.
- Ogunleye, D. S. and Ibitoye, S. F. (2003): Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia Americana*, Tropical Journal of pharmaceutical Research, 2, 239-241.
- Pedersen-Bjergaard, S., and Rasmussen, K. E.(2004): Gasskromatografi. In legemiddelanalyse, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke As, S. 193-211.

- Pérez, s., Rodríguez-Carvajal, M.A. and Doco, T. (2003).: A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in Quest of a function. *Biochimie*, 85, (1-2), 109-121.
- Paulsen, B.S. and Barsett, H. (2005): Bioactive pectic polysaccharides. In Heinze, T (red.): *Polysaccharides I, Structure Characterization and Use*, 186, Springer-Overlag Berlin, s. 69-101.
- PROMEGACORPORATION2009(2005): Griess reagent system.
<http://www.promega.com/tbs/tb229/tb229.pdf>. sett. 5.03.2010
- Richardson, J.F., Coulson, J. M., Harker, J. H. and Backhurst, J., H. (2002): Membrane separation processes. In Coulson & Richardson 's chemical engineerin: *Particle technology and separation processes*, bind 2, 5, Butterworth-Heinemann, s. 446-447.
- Robert, J. F. (1998): *Polysaccharides I Structure and Function*. In *essentials of carbohydrates chemistry*, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, S. 158-160.
- Rasmussen, K., E. (2005): Gasskromatografi. In Greibrokk, T., Lundanes, E. and Rasmussen, k.E. (red.): *Kromatografi*, Universitetsfolaget As, Aurskog, s. 109-153.
- Rodríguez-Carvajal, M. A., Hervé du Penhoat, C. Mazeau, K., Doco, T. and Pérez, S. (2003): The three-dimensional structure of mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: a combined molecular modeling and NMR investigation. *Carbohydrate Research*, 338, 7, S. 651-671.
- Remick, D. G. (1994): Macrophage-Derived Cytokines. In Van Oss, C.J. and Van Regenmortel, M. H. V. (red.) *Immunochemistry*, CRC Press, S. 38-45.
- USDA (2010): *Ximenia Americana L. I Plants Profile*,
<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=XIAM>, aksessert 12.04.2010.
- Store norske leksikon - frysetørking : www.sn.no/frysetorking, aksessert 20.08.2009
- Spectrum product instruction Manual (2005). Følgehefte til Spectra/Por[®] dialysemembraner.
- Sumihiro, H (2008): Analysis of Bindin sites of Sugar Chains by Methylation Analysis. In Taniguchi, N., Suzki, A., ITO, Y., Narimatsu, H., Kawasaki, T. and Sumihiro, H (red.): *Experimental Glycoscience, Glycochemistry*, Springer, S. 54-55.
- Srivastava, L. M. (2002): Cell Wall, Cell Division, and Cell Growth. I *SOME SPECIAL ASPECTS OF PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT: Hormoners and Environment*, Academica Press, S. 25-26.
- Schols, H. A. and Voragen, A.G. (2002): The chemical structure of pectins. In Seymour, G. B. and Knox, J.P. (red.): *Pectin and their manipulation*, Backwell, S. 1-25.

- Schepetkin, I. A. and Quinn, M. T. (2006): Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*, 6, 3, 317-333.
- Scand, M. and Vautier, H. (2006): *Ximenia americana* L. In SEED LEAFLET, 112, Millennium Seed Bank project, S. 1-2.
- Soro, T. Y., Traore, F. and Sakande, J. (2009): Analgesic activity of the aqueous extract from *Ximenia Americana*, *pharmacology/toxicology*, 332, 371-377.
- SPEKTRUM (2005): Spectrum product instruction, Følgehefte til Spectra/Por dialysemembraner.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2006): Cell Walls: Structure, Biogenesis, and Expansion. In *Pant Physiology*, 4, Sinauer Associates, INC., Publisher, S. 350-365.
- Visser, J. and Voragen, A.G. J. (1996): Complex Pectins, Structure Elucidation using enzymes. In *Pectins and Pectinases: Progress in Biotechnology*, bind 14, Elsevier Science B.V., S. 4-6.
- Voss, C., Eyol, E. and Berger, M. R. (2006): Identification of potent anticancer activity in *Ximenia Americana* aqueous extracts used by African traditional medicine, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 211, 177-187.
- Voss, C., Eyol, E., Frank, M., Von der lieth CW, and Berger, M.R. (2006): Identification and characterization of ripoximin, a new type II ribosome-inactivating protein with antineoplastic activity from *Ximenia Americana*, *Journal of The Federation of American societies for Experimental Biology*, 20, 1194-1196.
- Yolanda, B. and Cui, S. W. (2005): Understanding Carbohydrate Analysis. In Cui, S. W. (red.): *Food carbohydrates. Chemistry, physical properties and Applications*, CRC Press, Taylor & Francis Group, S. 67-71.
- Witabouna, k. M. and Kagoyire, K. A. (2008): West African plants and related Phytochemicals with Anti-multidrug-Resistance Activity. In Ahmad, I., Aqil, F. (Red.): *New Strategies Combatin Bacterial Infection*, Wiley-VCH, S. 140-146.